

Carolina Eto

**IDENTIFICAÇÃO DE UMA SUBPOPULAÇÃO DE
MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA COM ALTA
CAPACIDADE DE ADESÃO À *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. André Báfica

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Eto, Carolina

Identificação de uma subpopulação de macrófagos derivados
de medula óssea com alta capacidade de adesão à
Mycobacterium tuberculosis / Carolina Eto ; orientador,
André Báfica - Florianópolis, SC, 2016.
91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Macrófagos. 3. *Mycobacterium
tuberculosis*. I. Báfica, André. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. III. Título.

**"Identificação de uma subpopulação de macrófagos derivados de medula óssea
com alta capacidade de adesão à *Mycobacterium tuberculosis*"**

Por

Carolina Eto

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (08/PPGFMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr(a) André Luiz Barbosa Báfica (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Dário Simões Zamboni (Universidade de São Paulo)



Dr(a) Ricardo Ruiz Mazzon (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) João Batista Calixto (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 09 de março de 2016.

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha mãe Kumiko Eto, à minha mãe Missako Eto Leal e à minha madrinha Fumie Eto, por sempre me incentivarem a carreira acadêmica e serem meus exemplos de amor, dedicação e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Ao professor André Báfica, por aceitar me orientar durante os dois anos de mestrado e durante um ano de iniciação científica. Em poucas palavras, mas com muita gratidão agradeço-o por todos os ensinamentos científicos adquiridos nestes anos, por sua empolgação científica contagiante, pelo exemplo de amor à ciência, pelas discussões (científicas ou não) enriquecedoras, por sempre me oferecer oportunidades de aprendizado, por aguçar meu senso crítico e por buscar o melhor de cada um de nós.

Ao professor Daniel Mansur, pelo exemplo de profissional, pelas discussões científicas, profissionais e pelas conversas descontraídas.

Ao professor Fernando Spiller pelas discussões científicas e profissionais.

À Livia H. Yamashiro, minha primeira mentora no laboratório, por compartilhar seus conhecimentos comigo, por ajudar a realizar os experimentos deste trabalho e pelas discussões incansáveis de resultados. Agradeço também pela amizade e por todas as palavras de apoio e incentivo durante esses anos.

À Stefanny V. Morales (Puka), minha segunda mentora no laboratório, por compartilhar seus conhecimentos comigo, por dividir tantas e tantas horas laboratoriais, deixando-as mais agradáveis e divertidas. Agradeço também pela amizade e por tantos lanches divididos neste período.

Ao Daniel Mendes pela ajuda na realização dos experimentos dessa dissertação. Pela parceria, paciência e compreensão imensuráveis.

Ao Murilo Delgobo pela ajuda na realização dos experimentos, principalmente na reta final. Pelas discussões calorosas de artigos e as piadas compartilhadas.

Ao Lucas Mascarin, pela ajuda na realização dos experimentos desse trabalho, pelos tantos anos de amizade, boa parte deles divididos dentro de laboratórios, pelo companheirismo infinito e apoio de sempre.

Ao Daniel O. Patrício, pelos ensinamentos sobre citometria, pelas discussões sobre macrófagos e pela amizade.

À Dra. Liliana Massis, Prof. Dr. Dario Zamboni e Prof. Dr. José Carlos Alves Filho da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto pela doação de medulas ósseas de animais nocautes utilizadas nessa dissertação.

À todos os demais membros do laboratório, Cristina Lorenzini, Renata Fleith, Adara Áurea, Mari Maraschin, Paula Fernandes, Rafael Bezerra, Dandara Paes, Vanessa Hunhoff, Marina Soncini, Fernanda

Morgana, por fazerem do LiDi o melhor ambiente de trabalho possível e sempre estarem ao meu lado quando preciso. E aos membros do Immunoweekends, por toda a empolgação nos fins de semana, pelas discussões sobre imunologia e pelos cafés-da-manhã agradáveis.

Ao professor Mario Steindel pelo exemplo de profissional, pelas conversas enriquecedoras e pelo incentivo à carreira acadêmica.

Aos membros e ex-membros do LANEN, professor Carlos Rogério Tonussi, Eduardo Souza Silva, Taciane Stein e Flora Lucena pelos ensinamentos, apoio e incentivo.

À amiga Bárbara Postal, por compartilhar as alegrias, tristezas, frustrações, sucessos e dúvidas da carreira acadêmica, por sempre me apoiar, me incentivar e pela amizade de todos esses anos.

À todos os docentes do Departamento de Farmacologia da UFSC que contribuíram para minha formação, em especial ao professor Antônio de Pádua Carobrez por me orientar durante o estágio em docência e compartilhar suas metodologias de ensino.

Às agências financiadoras, CAPES, CNPQ, Howard Hughes Medical Institute (HHMI) e National Institutes of Health (NIH).

“We find ourselves in the pleasurable position of being able to share the raw beauty of the world around us.”

David M. Eagleman

RESUMO

Elie Metchnikoff descreveu pela primeira vez os macrófagos e suas funções, uma delas é a fagocitose e eliminação de patógenos. Porém, alguns microrganismos desenvolveram estratégias para sobreviver dentro destas células, um exemplo de sucesso é o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), o agente causador da tuberculose humana. Este bacilo ganha acesso ao interior dos macrófagos utilizando receptores na superfície destas células. Devido à sua grande heterogeneidade, os macrófagos apresentam diversas moléculas em sua superfície, é possível que Mtb utilize diferencialmente essas moléculas para sua sobrevivência intracelular. A heterogeneidade dos macrófagos foi explorada neste trabalho através de duas subpopulações distintas de macrófagos derivados de medula óssea (MMOs). Estas subpopulações foram separadas, por citometria de fluxo, baseadas em características de tamanho, complexidade e por moléculas expressas em sua superfície. A subpopulação maior e mais complexa, foi denominada A e apresenta uma frequência média de 65%, já a subpopulação menor e menos complexa, denominada B, apresenta uma frequência média de 15%. Para estudar a interação destas subpopulações com Mtb, ensaios de adesão e fagocitose foram realizados. Foi possível observar que Mtb adere e é mais fagocitado pela subpopulação B, a qual foi caracterizada como SSC^{lo}FSC^{lo}F4/80^{int}CD11b^{int} quando comparada à subpopulação A. As análises de citometria de fluxo indicavam que CD195 (CCR5) era um receptor envolvido no aumento da interação entre a subpopulação B e Mtb, porém MMOs derivados de camundongos nocautes para este receptor apresentam o mesmo perfil de adesão que MMOs de camundongos selvagens. Além disso, também foi investigado se o estágio de maturação da subpopulação B poderia estar envolvido com o aumento da adesão destes macrófagos à Mtb, contudo o estágio de maturação não parece participar neste processo. Em conjunto, os dados deste trabalho mostram que macrófagos de medula óssea apresentam duas subpopulações distintas, chamadas A e B. A subpopulação B apresenta maior interação com Mtb e esta interação não é dependente de CD195. Além disso, a subpopulação B foi caracterizada como SSC^{lo}FSC^{lo}F4/80^{int}CD11b^{int} quando comparada à subpopulação A.

Palavras-chave: Macrófagos, subpopulações, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

Elie Metchnikoff first described macrophages and its functions, one of them is the phagocytosis and killing of pathogens. However, some microorganisms developed strategies to survive inside macrophages, one successful example is *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the causing agent of tuberculosis. This bacilli access the macrophage's intracellular environment through surface receptors. Because of its great heterogeneity macrophages express different surface molecules and it is possible that Mtb exploits these differentially expressed molecules to survive inside the cell. The heterogeneity of macrophages was explored here using two distinct subpopulations of bone marrow macrophages (BMMs). These subpopulations were separated by flow cytometry based on size and complexity and also by expression surface molecules. The subpopulation, which was bigger and more complex, was called A and displays a mean frequency of 65%, on the other side the smaller and less complex subpopulation, was called B and displays a mean frequency of 15%. To study the interaction between Mtb and these two subpopulations binding and phagocytosis assays were performed. It was observed that subpopulation B presents higher bacterial binding and phagocytosis and it was phenotypically characterized as $SSC^{lo}FSC^{lo}F4/80^{int}CD11b^{int}$ when compared to subpopulation A. The flow cytometry analysis indicates that CD195 (CCR5) was involved in higher bacterial binding of subpopulation B, nevertheless BMMs from mice knockout for CD195 showed the same levels of bacterial binding then wild-type BMMs. Furthermore, it was also investigated if the maturation status of subpopulation B could be associated with the augmented mycobacterial binding, however it does not seems to participate in this process. Taken together, these data shows that BMMs presents two distinct subpopulations, which were named A and B. The subpopulation B, displays higher bacterial binding and phagocytosis and CD195 does not participate in these processes. Additionally, subpopulation B was phenotypically characterized as $SSC^{lo}FSC^{lo}F4/80^{int}CD11b^{int}$ when compared to subpopulation A.

Key-words: Macrophages, subpopulation, *Mycobacterium tuberculosis*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Origem dos macrófagos teciduais | 22 |
| Figura 2 - Heterogeneidade na expressão de moléculas de superfície de macrófagos | 24 |
| Figura 3 - Estrutura da parede celular de Mycobacterium tuberculosis. | 27 |
| Figura 4 - Patogênese da tuberculose. | 28 |
| Figura 5 - Fluxograma da medida do perímetro e área das células | 40 |
| Figura 6 - Células de medula óssea de camundongos diferenciadas em macrófagos com sobrenadante de células L929, durante sete dias | 43 |
| Figura 7 - A subpopulação B adere mais à Mtb do que subpopulação A..... | 44 |
| Figura 8 - Células com área celular menor apresentam maior quantidade de bacilos associados do que células com área maior.. | 45 |
| Figura 9 - A subpopulação B fagocita mais Mtb do que subpopulação A..... | 46 |
| Figura 10 - A subpopulação B adere e fagocita mais BCG DsRed do que subpopulação A..... | 47 |
| Figura 11 – Triagem de moléculas de superfície de MMOs | 49 |
| Figura 12 - A subpopulação B é caracterizada como SSCloFSClo F4/80intCD11bint quando comparada coma subpopulação A..... | 51 |
| Figura 13 – A maior adesão à Mtb na subpopulação B está correlacionada a CD195, mas não a CD107a | 52 |
| Figura 14 - Células CD195 KO apresentam mesmo perfil de adesão de células WT | 53 |
| Figura 15 - Cinética de diferenciação e adesão dos MMOs à Mtb das subpopulações A e B..... | 54 |
| Figura 16 - Cinética da porcentagem de células F4/80+, CD11b+ e CD34+CD117+Sca1+ | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG - Bacilo de Calmette- Guérin
C5aR - Receptor do complemento 5^a
CCR5 – Receptor CC de quimiocina 5
CEUA /UFSC - Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina
CSF - Fator estimulador de colônia
CR - Receptor do complemento
DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
EGF - *Epidermal growth factor*
FVS - *Fixable Viability Stain*
GM-CSF - Fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos
LAMP - *Lysosome associated membrane protein*
M-CSF - Fator estimulante de colônias de macrófagos
MFI - Média da intensidade de fluorescência
MMOs - Macrófagos derivados de medula óssea
MOI - Multiplicidade de infecção
MIP - *Macrophage inflammatory protein*
Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*
PBS - *Phosphate Buffer Saline*
PFA – Paraformaldeído
RANTES - *Regulated on activation normal T cell expressed and secreted*
RAPG - Receptores acoplados à proteína G
SBF - Soro Bovino Fetal
TB – Tuberculose
UA - Unidades arbitrárias

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1. HISTÓRICO E ORIGEM DOS MACRÓFAGOS..... | 21 |
| 1.2. A HETEROGENEIDADE DOS MACRÓFAGOS..... | 22 |
| 1.3. O <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> | 26 |
| 1.4. <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> E OS MACRÓFAGOS | 29 |
| 2. OBJETIVOS | 33 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 33 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 3. METODOLOGIA..... | 35 |
| 3.1. COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS | 35 |
| 3.2. INSTALAÇÕES E CONDIÇÕES DOS ANIMAIS | 35 |
| 3.3. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA ... | 35 |
| 3.4. COLETA DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS L929 | 36 |
| 3.5. CULTIVO DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> H37Rv | 36 |
| 3.6. <i>MYCOBACTERIUM BOVIS</i> BACILO DE CALMETTE- GUÉRIN | 37 |
| 3.7. MARCAÇÃO DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> H37Rv COM SYTO 24..... | 37 |
| 3.8. ENSAIOS DE ADESÃO | 37 |
| 3.9. ENSAIOS DE FAGOCITOSE | 38 |
| 3.10. VIABILIDADE CELULAR COM FVS..... | 39 |
| 3.11. MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA..... | 39 |
| 3.12. MEDIDA DO PERÍMETRO E ÁREA DAS CÉLULAS E CONTAGEM DE BACIOS | 40 |
| 3.13. ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA | 41 |
| 3.14. CITOMETRIA DE FLUXO | 41 |
| 3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 42 |
| 4. RESULTADOS | 43 |
| 4.1. MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA APRESENTAM DUAS SUBPOPULAÇÕES DISTINTAS. | 43 |
| 4.2. A SUBPOPULAÇÃO B APRESENTA MAIOR LIGAÇÃO COM <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> QUANDO COMPARADO À SUBPOPULAÇÃO A..... | 44 |
| 4.3. A SUBPOPULAÇÃO B INTERAGE MAIS COM O BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN (BCG)..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4. A TRIAGEM DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR REVELOU QUE A SUBPOPULAÇÃO B É CARACTERIZADA COMO SSC ^{LO} FSC ^{LO} F4/80 ^{INT} CD11b ^{INT} | 48 |
| 4.5. A ADESÃO DE MTB À SUBPOPULAÇÃO B CORRELACIONA-SE COM A EXPRESSÃO DE CD195 E NÃO COM CD107A..... | 51 |
| 4.6. CÉLULAS DE CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA CD195 APRESENTAM O MESMO PERFIL DE ADESÃO QUE CÉLULAS DE ANIMAIS SELVAGENS QUANDO EXPOSTOS À MTB | 52 |
| 4.7. CINÉTICA DE DIFERENCIAÇÃO DOS MACRÓFAGOS DE MEDULA ÓSSEA. | 53 |
| 5. DISCUSSÃO | 57 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 65 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 66 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO E ORIGEM DOS MACRÓFAGOS

Os macrófagos foram descritos pela primeira vez por Elie Metchnikoff no final do século 19. Na época, Metchnikoff observou que quando espinhos eram inseridos em *Bipinnaria*, larvas de estrelas-do-mar, células migratórias envolviam esse corpo estranho (METCHNIKOFF, 1884a). O mesmo fenômeno foi observado quando pequenos crustáceos eram infectados com leveduras. Estas leveduras produziam esporos em forma de agulhas, a presença destes induzia o acúmulo das células migratórias envolta dos mesmos (METCHNIKOFF, 1884b). Ainda, Metchnikoff observou que estas células migratórias eram capazes de englobar bactérias (METCHNIKOFF, 1884a). A essas células ele deu o nome de fagócitos, células devoradoras, e ao processo deu o nome fagocitose (METCHNIKOFF, 1884a). Metchnikoff também descreveu a presença desses fagócitos em vertebrados e outras funções que eles desempenham, como a fagocitose de corpos apoptóticos durante a metamorfose de sapos (METCHNIKOFF, 1883). Já na década de 60, estudos feitos por van Furth e Cohn mostraram que os monócitos circulantes no sangue, derivados de progenitores na medula óssea, povoavam os tecidos na forma de macrófagos e a este conjunto de células deram o nome de sistema fagocítico mononuclear (VAN FURTH e COHN, 1968; VAN FURTH *et al.*, 1972). Porém, nos últimos anos vários trabalhos têm relatado a origem dos macrófagos residentes nos tecidos, mostrando que para alguns órgãos, os macrófagos são derivados de células progenitoras do saco vitelínico e do fígado fetal, e persistem até a idade adulta, independente dos monócitos circulantes no sangue (GINHOUX *et al.*, 2010; HOEFFEL *et al.*, 2012; SCHULZ *et al.*, 2012; GUILLIAMS *et al.*, 2013; HASHIMOTO *et al.*, 2013; YONA *et al.*, 2013). Por exemplo, um destes trabalhos mostrou que a micróglia, macrófagos residentes do sistema nervoso central, é derivada de células progenitoras presentes no saco vitelínico (GINHOUX *et al.*, 2010). Além disso, experimentos utilizando a deleção de c-Myb, um fator de transcrição necessário para a hematopoiese na medula óssea, mostraram que este fator é dispensável para o desenvolvimento de células de Kupffer, Langerhans e micróglia, indicando que estas células são geneticamente diferentes das células derivadas da medula óssea (SCHULZ *et al.*, 2012). Ainda, Hashimoto e colaboradores (2013) observaram que, ao remover os macrófagos do pulmão, a maioria da população do tecido acontece *in situ* sem contribuição dos monócitos

circulantes. Portanto, os macrófagos e monócitos presentes em camundongos são derivados de pelo menos três fontes distintas conforme sumarizado na figura 1.

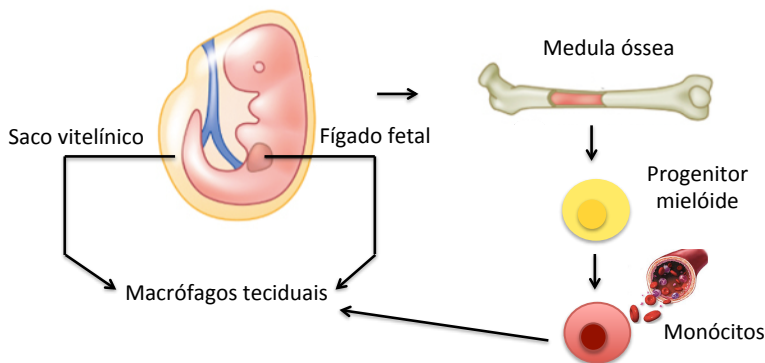


Figura 1: Origem dos macrófagos teciduais. Os macrófagos que povoam os tecidos são derivados de três fontes distintas, de progenitores do saco vitelínico e de fígado fetal e de progenitores da medula óssea.

1.2. A HETEROGENEIDADE DOS MACRÓFAGOS

Após povoarem os tecidos, os macrófagos desempenham diferentes funções dependendo do órgão em que se encontram. Estas células participam de diversos processos, desde o desenvolvimento do organismo até a resposta a patógenos. A importância dos macrófagos durante o desenvolvimento foi evidenciada por uma mutação no gene que codifica o fator estimulador de colônia (CSF)-1. Essa mutação gera camundongos deficientes em macrófagos, os quais apresentam anormalidades no cérebro e na medula óssea (MICHAELSON *et al.*, 1996; CECCHINI *et al.*, 1997). Além disso, os macrófagos participam da remoção de células apoptóticas durante o desenvolvimento, ajudam na angiogênese e na formação dos vasos sanguíneos (HOPKINSON-WOOLLEY *et al.*, 1994; LOBOV *et al.*, 2005). Nos ossos, os macrófagos, também chamados de osteoclastos, fazem a reabsorção óssea, ajudando a manter a homeostase neste tecido e, a deficiência na atividade destas células leva a osteoporose (YOSHIDA *et al.*, 1990). Já na medula óssea, os macrófagos auxiliam na eritropoiese e mantém as células tronco hematopoiéticas em seus nichos (YOSHIDA *et al.*, 2005;

CHOW *et al.*, 2011). No sangue, os monócitos são responsáveis por limpar os debris das células endoteliais (CARLIN *et al.*, 2013). A imunovigilância no fígado é feita por macrófagos móveis, enquanto que os sésseis (células de Kupffer) são designados a fazer o *clearance* de microrganismos e células circulantes no sangue, principalmente os eritrócitos (KONDO *et al.*, 1988; KLEIN *et al.*, 2007). Os macrófagos esplênicos efetuam a remoção de células apoptóticas, eritrócitos, colaboram no metabolismo do ferro, além de também fazer a imunovigilância do baço (KRISTIANSEN *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2004; SCHAER *et al.*, 2006; MIYAKE *et al.*, 2007).

Nos pulmões, os macrófagos alveolares participam na homeostase, do metabolismo de surfactantes e da imunidade contra patógenos inalados (DRANOFF *et al.*, 1994; IKEGAMI *et al.*, 1996; CHEUNG *et al.*, 2000). No tecido adiposo, os macrófagos contribuem para o metabolismo da glicose juntamente com eosinófilos e estão envolvidos na sensibilidade a insulina (ODEGAARD *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2011). No sistema nervoso central, a micróglia tem papel na sobrevivência neuronal, na imunovigilância, na sinapse e na remoção de neurônios mortos (SONNENFELD e JACOBS, 1995; PAOLICELLI *et al.*, 2011; LONDON *et al.*, 2013). No trato gastrointestinal, os macrófagos mantém a homeostase e estão envolvidos na regulação da resposta imune contra a microbiota (RAKOFF-NAHOUM *et al.*, 2004; SMYTHIES *et al.*, 2005; UEDA *et al.*, 2010). Os macrófagos peritoniais tem papel na imunidade contra patógenos, homeostase e na retirada de células apoptóticas do tecido (WIKTOR-JEDRZEJCZAK *et al.*, 1996; SCOTT *et al.*, 2001; CAILHIER *et al.*, 2005). Na pele, essas células exercem funções na manutenção do equilíbrio homeostático e no reparo do tecido (CHORRO *et al.*, 2009; MIRZA *et al.*, 2009; LUCAS *et al.*, 2010; TAMOUTOUNOUR *et al.*, 2013).

Estas funções enfatizam a grande heterogeneidade dos macrófagos, a qual é refletida nas moléculas que estas células expressam em sua superfície (Figura 2) (LAVIN e MERAD, 2013).

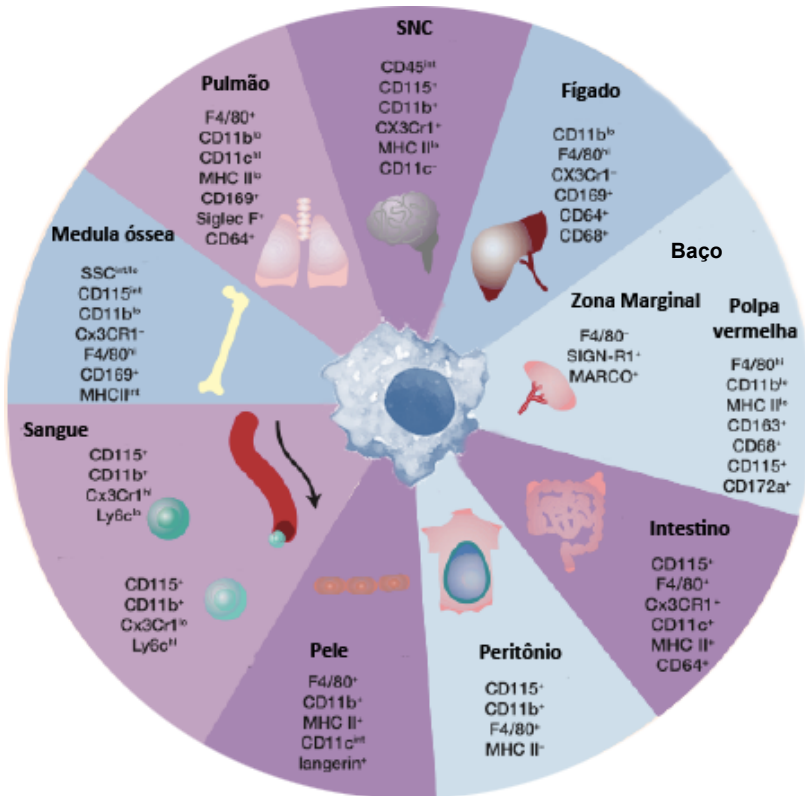


Figura 2: Heterogeneidade na expressão de moléculas de superfície de macrófagos. Moléculas de superfície expressas em macrófagos do sistema nervoso central, fígado, baço, intestino, peritônio, pele, sangue, medula óssea e pulmão (Adaptado de Lavin e Merald, 2013).

Uma das primeiras funções descritas dos macrófagos é a de fagocitar e eliminar patógenos, como mostrado por Metchnikoff (1884b) e por outros cientistas ao longo dos anos (JONSSON *et al.*, 1985; CAMPBELL *et al.*, 2001; ANAND *et al.*, 2007; HOUGHTON *et al.*, 2009; MANNI *et al.*, 2011). Porém, alguns patógenos desenvolveram estratégias diversificadas que culminam com a habilidade de sobreviver e proliferar dentro dos macrófagos. Um exemplo de sucesso é um microrganismo chamado *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (KOCH, 1882).

1.3. O *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

O Mtb tem tamanho variável, medindo cerca de 1 a 4 µm de comprimento e 0,3 a 0,6 µm de diâmetro (BRENNAN e NIKAIDO, 1995). É um bacilo aeróbio, de crescimento lento, cuja replicação leva aproximadamente 24 horas (HIRIYANNA e RAMAKRISHNAN, 1986). A parede celular desta bactéria é composta por um complexo covalente de ácidos micólicos, arabinogalactanos e peptídeoglicanos os quais são envoltos por uma cápsula de proteínas e polissacarídeos, estruturados de acordo com a figura 3 (LEDERER *et al.*, 1975; HIRIYANNA e RAMAKRISHNAN, 1986; COLE *et al.*, 1998). Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa, composta por 60 a 90 átomos de carbono e são o principal componente da parede celular das micobactérias, além disso a composição de polissacarídeos na cápsula pode variar de acordo com a cepa (ASSELINEAU e LEDERER, 1950; CHATTERJEE, HUNTER, *et al.*, 1992; CHATTERJEE, LOWELL, *et al.*, 1992). A estrutura da parede celular, rica em lipídeos, faz com que esse bacilo tenha característica álcool-ácida resistente, sendo coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, onde as bactérias são coradas com fucsina a quente e resistem a descoloração por uma solução álcool-ácida (BRANDT e LLOYD, 1954).

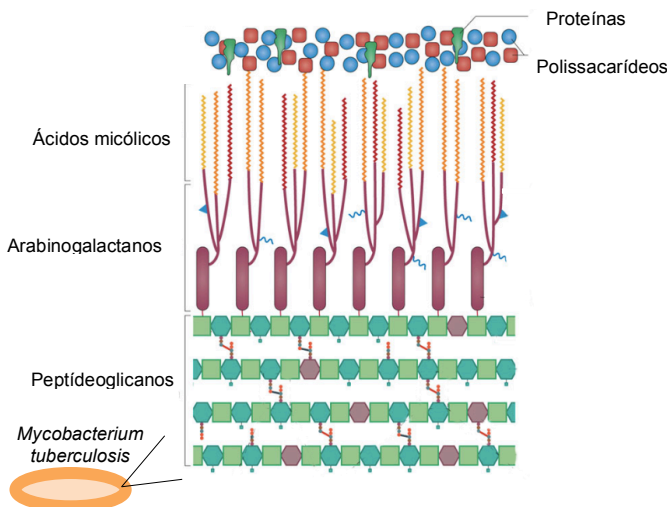


Figura 3: Estrutura da parede celular de *Mycobacterium tuberculosis*. A parede celular do Mtb é composta por uma camada de ácidos micólicos, arabinogalactanos, peptídeoglicanos, circundados por uma cápsula de proteínas e polissacarídeos (Adaptado de Kieser e Rubin, 2014).

Além dessas características, esse bacilo também é o agente causador da tuberculose (TB) (KOCH, 1882). A tuberculose foi responsável por 1,5 milhões de mortes e 9,6 milhões de novos casos no mundo, em 2014 (WHO, 2015). O Brasil está entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos de TB mundial, juntamente com Índia, China, Indonésia, Mianmar, Zimbábue, Etiópia, Filipinas, Uganda, Paquistão e Vietnã (WHO, 2015). Cerca de 3,5% dos novos casos e 20,5% de casos de reincidência são devidos a multirresistência a drogas e destes 9% são considerados extensivamente resistentes (WHO, 2015). A transmissão desta doença ocorre quando bacilo é expelido por pessoas infectadas, através da tosse, e inaladas por pessoas não infectadas (GLICKMAN e JACOBS, 2001). Nos pulmões, o patógeno infecta os macrófagos e outros tipos celulares como células dendríticas e neutrófilos (BERTHRONG, 1968; MAY e SPAGNUOLO, 1987; HENDERSON *et al.*, 1997). As células dendríticas captam os bacilos e migram para os linfonodos para fazer a apresentação de antígenos às células T, após o contato com as células dendríticas nos linfonodos, as células T vão ao local da infecção onde circundam os macrófagos, células dendríticas e células epiteliais infectadas, formando o

granuloma, estrutura celular característica da tuberculose (Figura 4) (MEDLAR, 1955; TAILLEUX *et al.*, 2003; TIAN *et al.*, 2005; WOLF *et al.*, 2007; O'GARRA *et al.*, 2013). Conforme o granuloma amadurece, ele adquire uma cápsula fibrosa que envolve as células infectadas e mantém a tuberculose em um estado latente, sendo chamado de granuloma fibrótico. Posteriormente, o granuloma pode se transformar em um granuloma calcificado, ou então, em cerca de 10% dos casos, a bactéria volta a se replicar no interior do granuloma, causando necrose das células em sua estrutura central liberando bactérias viáveis nas vias aéreas, esse granuloma é chamado, granuloma caseoso e caracteriza a fase ativa da doença (FLYNN e CHAN, 2003; ULRICHS e KAUFMANN, 2006; SAUNDERS e BRITTON, 2007).

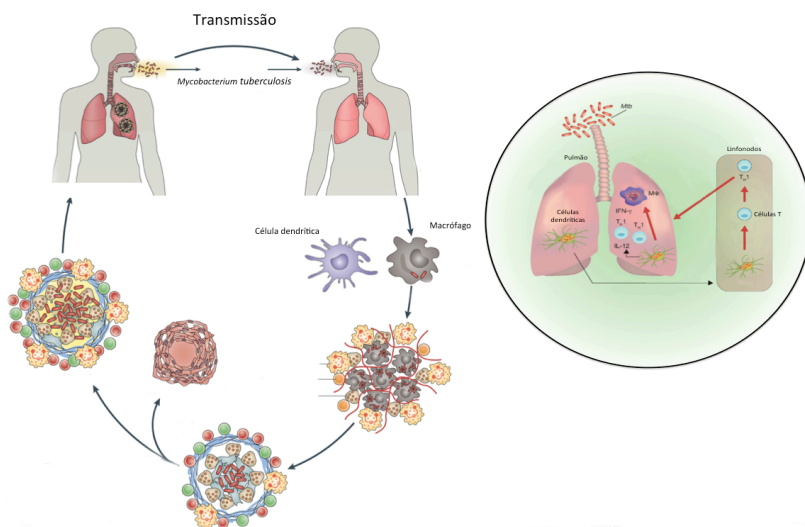


Figura 4: Patogênese da tuberculose. No pulmão, após serem inalados, os bacilos da tuberculose são capturados pelas células dendríticas, processados e apresentados a células T nos linfonodos. As células T primadas voltam para o pulmão onde irão circundar macrófagos e células dendríticas e epiteliais para formar o granuloma. (Adaptado de Redford, Murray e O'Garra, 2011).

Após o estabelecimento da doença, ela pode ser curada, para o tratamento da tuberculose causada por cepas não resistentes são usados os fármacos de primeira linha, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol e, para os casos de cepas multirresistentes são usados os

fármacos de primeira linha em associação com aminoglicosídeos, tioaminas, fluoroquinolonas e peptídeos cíclicos (WHO, 2015). Para os casos de cepas extensivamente resistentes, fármacos de primeira e segunda linha são associados com canamicina, capreomicina e amicacina (WHO, 2015). A duração do tratamento é em média de 6 a 9 meses, nos casos de multirresistência pode chegar até dois anos (SHENOI *et al.*, 2009). O tempo prolongado e os efeitos colaterais destes medicamentos aumentam as chances de desistência do tratamento e a incidência de cepas mais resistentes (YEE *et al.*, 2003; TORUN *et al.*, 2005).

1.4. *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E OS MACRÓFAGOS

Embora o Mtb seja transmitido pelo ar e atinja preferencialmente os pulmões, outros tecidos também podem ser alvos deste bacilo (KOCH, 1882). Já foram descritos casos da instalação da doença em ossos, olhos, meninges, cérebro, pele, laringe, articulações, linfonodos, pericárdio, pleura, trato gastrointestinal, rins, peritônio, trato gênito-urinário e ainda pode atingir o fígado e o baço como consequência da TB miliar, uma forma disseminada da doença (DUZGUN *et al.*, 2002; GOLDEN e VIKRAM, 2005; MAHYUDIN *et al.*, 2010; DAHER EDE *et al.*, 2013; VENYO, 2015; VIEGAS *et al.*, 2015; YARI *et al.*, 2015; OISHI *et al.*, 2016). Esta capacidade de infectar diferentes tecidos, indica que Mtb é capaz de interagir com diversas subpopulações de macrófagos presentes no organismo e se adaptar ao microambiente local.

Esta interação entre macrófagos e Mtb foi estudada por Metchnikoff em 1888, e mesmo após quase 130 anos de estudos, a maneira como este patógeno interage com estas células ainda não é completamente entendida (METCHNIKOFF, 1888). O acesso ao interior de macrófagos por Mtb é mediado por receptores de superfície. Inicialmente, os receptores do complemento e de manose foram mostrados como sendo responsáveis pela interação inicial entre patógeno e hospedeiro, contudo a inibição destes receptores provoca apenas uma diminuição na fagocitose, indicando a existência de outros receptores participantes no processo (SCHLESINGER *et al.*, 1990; SCHLESINGER *et al.*, 1996; ROOYAKKERS e STOKES, 2005). De fato, outros receptores de superfície de macrófagos foram demonstrados como participantes na interação entre estas células e Mtb, receptores do tipo scavenger, do tipo toll, receptores Fc, CD14, receptores para

proteínas surfactantes e receptores *mincle* (ARMSTRONG e HART, 1975; UNDERHILL *et al.*, 1999; MEANS *et al.*, 2001; BAFICA *et al.*, 2005; ISHIKAWA *et al.*, 2009; SCHAFER *et al.*, 2009; HAWKES *et al.*, 2010; SEVER-CHRONEOS *et al.*, 2011; BEHLER *et al.*, 2012). Além disso, a cooperação entre receptores também pode ocorrer, em um estudo a cooperação entre os receptores do complemento 1 (CR1) e 3 (CR3) aumentou a capacidade de adesão de monócitos a partículas opsonizadas (SUTTERWALA *et al.*, 1996). A utilização de certos receptores de superfície pode ser vantajosa para patógenos intracelulares. Por exemplo, *Leishmania major* ativa a via alternativa do sistema complemento e C3b é depositado em sua superfície, quando promastigotas metacíclicos se ligam a CR1 eles sobrevivem e conseguem se replicar (MOSSER e EDELSON, 1987). Contudo, quando promastigotas infectam macrófagos via o domínio de lectina do CR3 estas formas são eliminadas (DA SILVA *et al.*, 1989). O mesmo perfil é observado em infecções de macrófagos por *Salmonella typhi*, quando este patógeno utiliza CR3 para infectar a célula, a bactéria é fagocitada em uma vesícula que funde com lisossomo. Porém quando *S. typhi* utiliza CR1, não foram observados marcadores lisossomais associados a ela (ISHIBASHI e ARAI, 1990). Utilizando o mesmo raciocínio, experimentos com o bloqueio de receptores de manose ou do complemento foram realizados com Mtb. Porém, não foram observadas alterações na sobrevivência ou no crescimento intracelular durante a infecção de macrófagos humanos (ZIMMERLI *et al.*, 1996). Contudo, estas observações não excluem a possibilidade de outros receptores envolvidos no reconhecimento de Mtb participarem do destino intracelular da bactéria. Neste contexto, os primeiros momentos da infecção, os quais as moléculas de superfície de macrófagos interagem com a bactéria parecem ser decisivos para a sobrevivência do patógeno (MOSSER e EDELSON, 1987; DA SILVA *et al.*, 1989; ISHIBASHI e ARAI, 1990).

Desta maneira, levando em consideração a diversidade dos macrófagos, a hipótese desse trabalho é que a expressão de algumas moléculas de superfície em subpopulações destas células leva à interação diferenciada com Mtb. Essa hipótese surgiu durante experimentos iniciais realizados por nosso grupo, onde foi observado uma ligação aumentada dessa bactéria a uma subpopulação de macrófagos derivados de medula óssea. Estes resultados sugeriram uma heterogeneidade na interação entre estes macrófagos e Mtb.

Os macrófagos derivados de medula óssea (MMOs) podem ser gerados ao expor células de medula óssea ao fator estimulante de

colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), ao fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) e ao sobrenadante de células L929, fonte de M-CSF (STANLEY *et al.*, 1976; BURGESS *et al.*, 1977; YAMAMOTO-YAMAGUCHI *et al.*, 1983; LADNER *et al.*, 1988; WILTSCHEKE *et al.*, 1989). As células da medula óssea quando expostas ao sobrenadante de células L929, durante 7 a 8 dias, se diferenciam em macrófagos que ficam aderidos a uma superfície plástica (YAMAMOTO-YAMAGUCHI *et al.*, 1983; BOLTZNITULESCU *et al.*, 1987). Os MMOs, diferenciados com sobrenadante de L929, são um modelo utilizado para estudar a interação entre estas células e o bacilo da tuberculose (FLESCHE e KAUFMANN, 1987; CHACON-SALINAS *et al.*, 2005; PODINOVSKAIA *et al.*, 2013). Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar detalhadamente as características das subpopulações de macrófagos derivados de medula óssea e sua interação com *Mtb*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar os primeiros passos da interação de *Mycobacterium tuberculosis* com macrófagos derivados de medula óssea.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I - Caracterizar as subpopulações de macrófagos derivados de medula óssea.

II - Estudar a interação das subpopulações de macrófagos com Mtb.

3. METODOLOGIA

3.1. COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

O uso de animais neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA – UFSC), sob o protocolo PP00880.

3.2. INSTALAÇÕES E CONDIÇÕES DOS ANIMAIS

Os camundongos eram provenientes do biotério setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) da UFSC e foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h, a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e regime *ad libitum*. Além disso, os camundongos foram mantidos dentro de caixas de acrílico, em estante ventilada com água e serragem autoclavadas.

3.3. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Camundongos de ambos os sexos, da linhagem C57/BL6 e idade entre 6 a 8 semanas foram eutanasiados, ao final da tarde, e os membros posteriores foram retirados e dissecados, em fluxo laminar, a fim de isolar o fêmur e a tíbia. Os ossos foram mantidos em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) até o momento da retirada da medula. Em condições assépticas, as epífises dos ossos foram removidas com uma lâmina de bisturi número 23 e, utilizando uma seringa com agulha de insulina, a medula foi removida do interior dos ossos com Phosphate Buffer Saline (PBS, Lonza). A suspensão de células da medula foi centrifugada a $1200 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi resuspendido em DMEM suplementado com 20% de sobrenadante de L929, 10% Soro Bovino Fetal (SBF, Hyclone), Piruvato de sódio 1mM (Sigma), L-glutamina 2mM (Invitrogen) e HEPES 25mM (Life Technologies). Esta suspensão foi distribuída em placas de 6 poços, contendo 3 ml em cada poço, e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . No quinto dia de cultivo foram adicionados mais 2 ml de DMEM suplementado, e as células foram

incubadas nas mesmas condições até o sétimo dia de cultivo. Segundo a experiência do nosso laboratório, um camundongo fornece, em média, $1,5 \times 10^7$ células diferenciadas em macrófagos. Esse valor foi considerado para decidir quantos animais seriam utilizados em cada experimento. Observação: Na experiência do nosso laboratório não há diferenças entre macrófagos derivados de medula óssea de camundongos machos ou fêmeas.

3.4. COLETA DE SOBRENADANTE DE CÉLULAS L929

Aliquotas de células L929 foram descongeladas, lavadas com meio DMEM mais 20% de SBF e colocadas em garrafas de cultura de 75 cm² até atingirem confluência. Após esse período as células foram lavadas com PBS e depois incubadas com tripsina (Lonza) durante 5 minutos a 37°C. As células foram então destacadas utilizando uma pipeta estéril e descartável. Estas células foram contadas e 3×10^6 foram colocadas em uma garrafa de cultura de 150 cm². Nesta garrafa foram adicionados 20 ml de meio DMEM suplementado com 10% Soro Bovino Fetal (SBF, Hyclone), Piruvato de sódio 1mM (Sigma), L-glutamina 2mM (Invitrogen) e HEPES 25mM (Life Technologies). No dia seguinte, foram adicionados mais 80 ml de meio DMEM suplementado e estas células foram deixadas com o meio durante 6 dias. Após esse período todo o sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro 0,22 µm, alíquotado em tubos de 50 ml e outros 100 ml de DMEM suplementado foi adicionado a cultura. Depois de 7 dias, todo o sobrenadante foi coletado novamente, filtrado e alíquotado da mesma maneira.

3.5. CULTIVO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RV

As colônias de H37Rv eram mantidas através de repiques semanais de amostras congeladas em freezer -80°C. Após o descongelamento, a suspensão bacteriana foi colocada em meio sólido Löwestein-Jensen (Laborclin) e mantidas a 37°C até o 30º dia de cultura. Todos os experimentos com H37Rv foram realizados em cabine de fluxo laminar classe B2, seguindo as normas apropriadas de biossegurança.

3.6. *MYCOBACTERIUM BOVIS* BACILO DE CALMETTE- GUÉRIN

Mycobacterium bovis BCG cepa Pasteur expressando uma proteína vermelha DsRed, como descrito previamente (ABADIE *et al.*, 2005; DE FARIA *et al.*, 2012), foram utilizadas a partir de amostras congeladas freezer -80°C contendo 3×10^8 bactérias/ml.

3.7. MARCAÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RV COM SYTO 24

Uma suspensão bacteriana em PBS foi ajustada para a escala 1 de Mc Farland (3×10^8 bactérias/ml). A suspensão foi dividida em tubos plásticos de 1,5 ml e SYTO 24 5mM (Life Technologies) foi adicionado para obter uma concentração final de 1 μ M. Seguiu-se com a incubação a 37°C durante uma hora. Após esse período os tubos foram centrifugados a 20.000 x g por 20 minutos, a temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado e as bactérias foram lavadas com 1 ml de PBS e novamente centrifugada nas mesmas condições. O pellet final foi ressuspendido em DMEM não suplementado.

3.8. ENSAIOS DE ADESÃO

Após sete dias de diferenciação, o sobrenadante da cultura dos MMOs foi removido e os poços lavados com 1 ml de PBS. Para o destacamento das células do fundo do poço, as células foram incubadas com 500 μ l de Accutase (Sigma) a 37°C e 5% de CO₂ por 10 minutos. Em seguida, a monocamada de células foram destacadas com uma micropipeta de 1000 μ l. A suspensão de células foi centrifugada a 800 x g por 5 minutos e ressuspendidas em DMEM suplementado com 10% de SBF, Piruvato de sódio 1mM, L-glutamina 2mM e HEPES 25mM. As células ficaram repousando durante 1 hora e meia a 37°C e 5% de CO₂, com o propósito de recuperar possíveis danos a membrana celular causada pela incubação com Accutase. As células foram novamente centrifugadas a 800 x g por 5 minutos e ressuspendidas em DMEM não suplementado. A quantidade de 5×10^5 células foi colocada em 200 μ l de DMEM em tubos plásticos de 1,5 ml e colocadas no gelo por 10 minutos. Em seguida, ainda no gelo, a suspensão de bactérias (H37Rv

ou BCG DsRed) foi adicionada às células, em multiplicidade de infecção (MOI) de 30, por 1 hora. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 800 x g por 5 minutos, o pellet foi lavado com 1ml de PBS gelado e ressuspensionado em 200 µl paraformaldeído 2% (PFA 2%) e incubado durante a noite na geladeira. Quando as amostras eram para citometria de fluxo as células foram ressuspensionadas em 10 µl de uma solução contendo PBS + 1% SBF e *Fcblock* (CD16/CD32, 1:100) e os anticorpos contra os antígenos de interesse adicionados a essa solução na concentração 1:100. A marcação com anticorpos foi realizada durante uma hora no gelo e depois as células foram lavadas com 1 ml de PBS gelado.

3.9. ENSAIOS DE FAGOCITOSE

Ao fim do sétimo dia de diferenciação, o sobrenadante da cultura dos BMMS foi removido e os poços lavados com 1 ml de PBS. Para o destacamento das células do fundo do poço, as células foram incubadas com 1 ml de Tripsina (Lonza) a 37°C e 5% de CO₂ por 8 minutos. Em seguida, as células foram destacadas com uma micropipeta de 1000 µl. A suspensão de células foi centrifugada a 800 x g por 5 minutos e ressuspensionadas em DMEM suplementado com 10% de SBF, Piruvato de sódio 1mM, L-glutamina 2mM e HEPES 25mM. Foram colocadas 5x10⁵ células por poço em placas de poços chatos e incubadas *overnight* a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação as células foram infectadas (MOI = 30) com a suspensão de bactérias (H37Rv ou BCG) por 4 horas, nas mesmas condições. Depois as células foram lavadas com 1 ml de PBS e destacadas com Accutase a 37°C e 5% de CO₂ por 10 minutos. Em seguida, as células foram destacadas com uma micropipeta de 1000 µl e a suspensão foi centrifugada a 800 x g por 5 minutos e ressuspensionadas em 200 µl PFA 2% e incubado durante a noite na geladeira. Quando as amostras eram para citometria de fluxo as células foram ressuspensionadas em 10 µl de uma solução contendo PBS + 1% SBF e *Fcblock* (CD16/CD32, 1:100) e os anticorpos contra os antígenos de interesse adicionados a essa solução na concentração 1:100. A marcação com anticorpos foi realizada durante uma hora no gelo e depois as células foram lavadas com 1 ml de PBS gelado.

3.10. VIABILIDADE CELULAR COM FVS

Para o teste de viabilidade foi utilizado o reagente BD Horizon™ Fixable Viability Stain (BD Bioscience), este composto é um corante de aminas que reage e liga-se covalentemente a aminas de superfície e intracelulares. Os MMOS retirados dos poços com Accutase foram deixados descansar por 1 hora e meia em DMEM suplementado com 10% de SBF, Piruvato de sódio 1mM, L-glutamina 2mM e HEPES 25mM a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período as células foram lavadas com PBS e marcadas com FVS 0,25 µg/ml por 15 minutos, a temperatura ambiente e protegido da luz. Após o período de marcação as células foram lavadas com PBS + 1% SBF. A análise das células foi realizada por citometria de fluxo.

3.11. MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA

Antes de entrar em contato com as células as lamínulas foram lavadas com água e sabão e enxaguadas com água destilada. Em seguida, foi feita uma lavagem com solução álcool-éter (1:1) e as lamínulas foram autoclavadas para posterior uso. Em fluxo laminar, foi adicionado 500 µl de PBS ao fundo das placas, posteriormente as lamínulas estéreis foram colocadas nos poços e o excesso de PBS foi retirado. A fixação das lamínulas foi verificada, depois 5x10⁵ BMMS foram adicionados ao poço e foram incubados durante a noite a 37°C e 5% de CO₂ para as células aderirem na lamínula. No dia seguinte, a suspensão bacteriana marcada com SYTO 24 foi adicionada às células (MOI = 30) e foram submetidas a duas condições diferentes; uma hora no gelo ou 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com 1 ml de PBS gelado e incubadas em 500 µl PFA 2% overnight. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas dos poços com uma pinça e secas com ajuda de um papel filtro. Uma gota de meio de montagem (ProLong Gold antifade reagent with DAPI, Life Technologies) foi colocado sobre uma lâmina de microscopia e a lamínula colocada sobre a gota. Esse reagente contém 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que se liga a timina e adenina no DNA, permitindo a visualização do núcleo celular. A visualização da fluorescência foi feita em microscópio Olympus BX40.

3.12. MEDIDA DO PERÍMETRO E ÁREA DAS CÉLULAS E CONTAGEM DE BACILOS

Foram escolhidos campos aleatórios na lâmina, no aumento de 400x, utilizando o campo claro como referência. Posteriormente, os filtros eram trocados a fim de identificar a fluorescência do núcleo celular e a fluorescência dos bacilos marcados com SYTO 24 e associados aos macrófagos. Os bacilos associados aos macrófagos eram contados diretamente no microscópio. As fotos de cada campo foram tiradas para sobreposição das imagens (*merge*). Esta foi feita utilizando o programa Adobe Photoshop CC 2014. Dessa maneira, o programa ImageJ foi usado para medir o perímetro e área da célula e associar com a quantidade de bacilos, conforme a Figura 5.

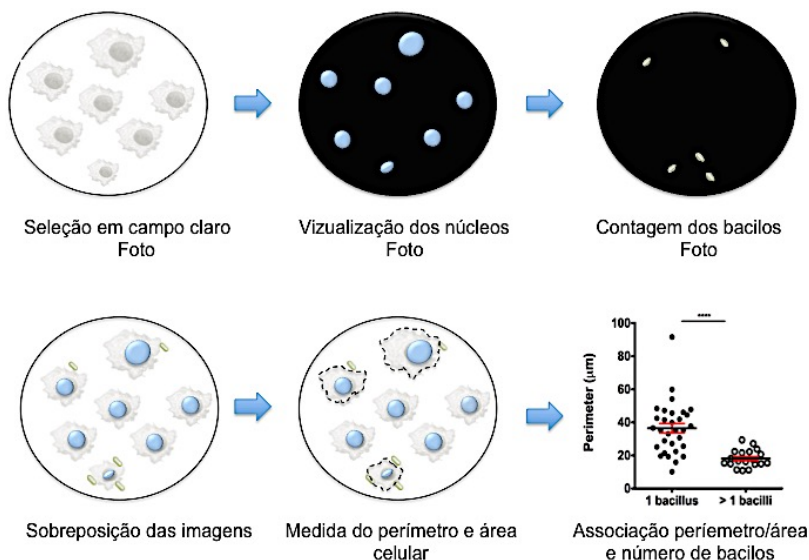


Figura 5: Fluxograma da medida do perímetro e área das células. Os campos foram selecionados em campo claro, após foram identificados os núcleos celulares utilizando DAPI e em seguida foi feita a contagem de bacilos marados com SYTO 24. Depois, as fotos foram sobrepostas e a medida do perímetro e área celular foram feitas.

3.13. ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

A medula óssea de camundongos foi coletada de acordo com o item 3.3. Imediatamente após a coleta as células foram utilizadas para fazer o ensaio de adesão do dia 0. As demais células foram colocadas em DMEM suplementado com 20% de sobrenadante de L929, 10% Soro Bovino Fetal (SBF, Hyclone), Piruvato de sódio 1mM (Sigma), L-glutamina 2mM (Invitrogen) e HEPES 25mM (Life Technologies). No terceiro dia de diferenciação o sobrenadante foi coletado e as células aderidas na placa foram destacadas com 500 µl de Accutase (Sigma) a 37°C e 5% de CO₂ por 10 minutos. Esses dois conjuntos de células foram utilizados para fazer o ensaio de adesão do dia 3. Para os ensaios do dia 5, as células foram coletadas no quinto dia de diferenciação e seguiu-se o mesmo protocolo do dia 3. Para ensaios do dia 7 seguiu-se o protocolo descrito em 3.3 e para o dia 10 as células foram deixadas na incubadora a 37°C e 5% de CO₂ até o décimo dia, o sobrenadante foi descartado e as células aderentes coletadas com 500 µl de Accutase. As células ficaram repousando durante 1 hora e meia a 37°C e 5% de CO₂, com o propósito de recuperar possíveis danos a membrana celular causada pela incubação com Accutase.

3.14. CITOMETRIA DE FLUXO

Após a incubação com a bactéria ou as células sem infecção foram centrifugadas (1200 x g por 5 minutos). O pellet formado foi ressuspenso em tubos de 1,5 ml utilizando 10 µl de uma solução contendo Fc Block (CD16/CD32, 1:100) e o mix de anticorpos desejados. A suspensão de células foi então incubada com os anticorpos durante uma hora no gelo, lavadas com 1 ml de PBS+1%SBF gelado e fixadas com 200 µl PFA 2% durante a noite. No dia seguinte as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo. Os anticorpos utilizados foram CD1d (clone 1B1, Biolegend), CD3 (clone 17A2, BD), CD4 (clone RM4-5, BD), CD8 (clone 53-6.7, BD), CD11b (clone M1/70, BD), CD11b (clone M1/70, Biolegend), CD11c (clone HL3, BD), CD19 (clone 6D5, Biolegend), CD34 (clone RAM 34, BD), CD40 (clone 23-Mar, BD), CD44 (clone IM7, BD), CD45(LCA) (clone 30-F11, BD), CD45R (clone RA3-6B2, BD), CD62L (clone MEL-14, BD), CD69 (clone H1-2F3, BD), CD80 (B7.1) (clone 16-10A1, BD), CD86 (clone

GL-1, Biolegend), CD88 (clone 20/70, BD), CD107a (clone 1D4B, BD), CD107a (clone 1D4B, eBioscience), CD107b (Mac-3) (clone M3/84, BD), CD115 (clone AFS98, eBioscience), CD117 (clone 2B8, BD), CD138 (clone 281-2, Biolegend), CD182 (clone TG11/CXCR2, Biolegend), CD195 (clone HM-CCR5, Biolegend), CD206 (clone C068C2, Biolegend), F4/80 (clone BM8, eBioscience), F4/80 (clone BM8, eBioscience), MHC classe II (I-Ab) (clone AF6-120.1, BD), Ly6G and Ly6C (clone RB6-8C5, BD), NK1.1 (clone PK136, BD), Sca-1 (clone D7, BD), TCR gd (clone GL3, Invitrogen).

As amostras foram adquiridas no citômetro FACSVerse ou FACSCanto II (Becton Dickinson Bioscience) e as análises foram feitas no software FlowJo versão 10.0.7 R2.

3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados são expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) e foram submetidos aos testes t de Student ou ANOVA de duas via e pós teste de Sidak. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA APRESENTAM DUAS SUBPOPULAÇÕES DISTINTAS.

A fim de analisar diferentes subpopulações, macrófagos derivados de medula óssea (MMO) foram divididos, por citometria de fluxo, em duas populações distintas baseados em características de tamanho (FSC) e complexidade (SSC). À essas subpopulações foi dado o nome de população A e B (Figura 6a). A população A apresenta frequência média de 65% e a população B de 15% (Figura 6b).

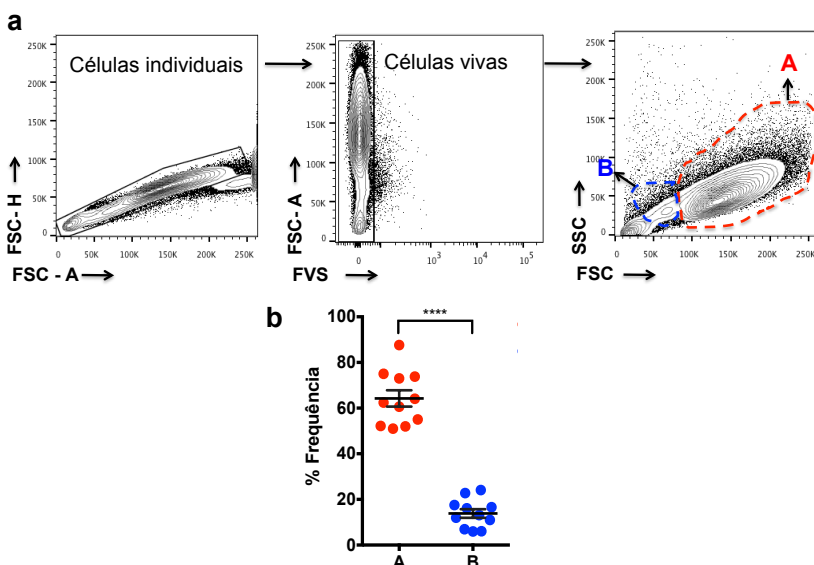


Figura 6: Células de medula óssea de camundongos diferenciadas em macrófagos com sobrenadante de células L929, durante sete dias. (a) Delineação em contorno, *contour plot*, representativo de macrófagos de medula óssea. Estratégia de *gating* e em destaque as subpopulações A e B (b) Porcentagem da frequência das subpopulações A e B. Os resultados representam a média \pm E.P.M., onde cada ponto representa um experimento independente. **** $p < 0,0001$, teste t de Student bicaudal.

4.2. A SUBPOPULAÇÃO B APRESENTA MAIOR LIGAÇÃO COM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* QUANDO COMPARADO À SUBPOPULAÇÃO A.

Após a exposição de MMOs à *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), marcado com um composto fluorescente (SYTO 24), foi observado que a subpopulação B apresenta uma média de 74% de células positivas para Mtb-SYTO 24, enquanto a subpopulação A apresenta uma média 42% de células positivas (Figura 7a e 7c). A média da intensidade de fluorescência (MFI) na subpopulação B também se mostrou aumentada, 906 unidades arbitrárias (UA), quando comparada com A, 447 UA (Figura 7b).

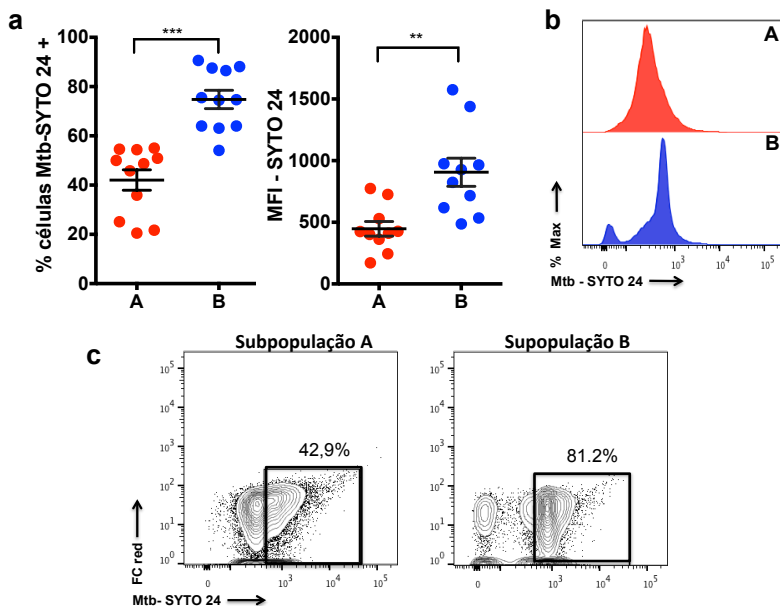


Figura 7: A subpopulação B adere mais à Mtb do que subpopulação A. MMOs foram expostos a Mtb-SYTO 24 (MOI=30) durante uma hora no gelo. (a) Porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência de Mtb-SYTO 24. (b) Histograma representativo da intensidade de fluorescência de Mtb-SYTO 24 para população A e B. (c) Dot plots representativos da porcentagem de células positivas para Mtb-SYTO 24 das subpopulações A e B. Os resultados representam média \pm E.P.M., onde cada ponto é representativo de um experimento independente, exceto em (c), na qual cada ponto é representativo de uma célula em um experimento. ** para $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, teste t de Student bicaudal.

Corroborando estes resultados, por meio de microscopia de fluorescência, foi possível observar que células com área menor, média de $14 \mu\text{m}^2$, se associavam, preferencialmente, com mais de um bacilo e células com área maior, média de $33 \mu\text{m}^2$, se associavam com apenas um bacilo (Figura 8a e 8b).

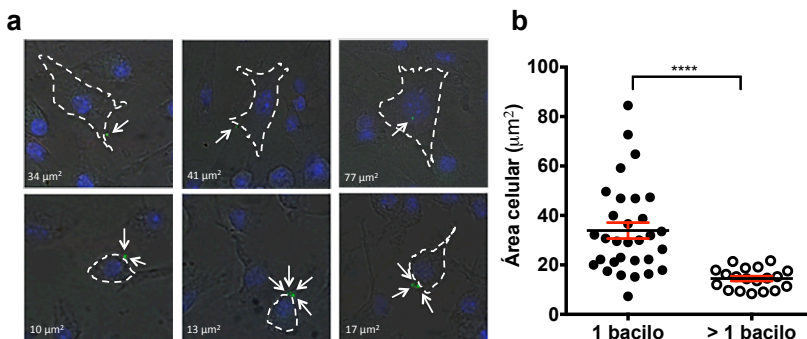


Figura 8: Células com área celular menor apresentam maior quantidade de bacilos associados do que células com área maior. (a) Fotomicrografias de MMOs expostos à Mtb, aumento de 400x. (b) Área celular de MMOs expostos à Mtb. Os resultados representam média \pm E.P.M., onde cada ponto é representativo de um experimento independente, exceto em (d), na qual cada ponto é representativo de uma célula em um experimento. **** $p < 0,0001$, teste t de Student bicaudal.

Após a aderência do bacilo ao macrófago o evento subsequente é a fagocitose, desta forma, uma incubação de 4 horas a 37°C foi feita a fim de permitir que esta célula fagocitasse Mtb (SCHLESINGER, 1996). Assim como nos ensaios de adesão, após a incubação de MMOs com Mtb-SYTO 24 durante 4 horas a 37°C , a subpopulação B exibiu maior fagocitose de Mtb quando comparada com A, apresentando uma média de 86% de células positivas para Mtb-SYTO 24 enquanto a subpopulação A apresentou uma média de 38% de células positivas (Figura 9a). A subpopulação B também mostrou maior média de intensidade de fluorescência, 1035 UA que a subpopulação A, 676 UA (Figura 9b). Os resultados de microscopia de epifluorescência novamente mostraram que células menores, média de $24 \mu\text{m}^2$, se associam, preferencialmente, com mais de um bacilo e células maiores, média de $36 \mu\text{m}^2$, com apenas um bacilo (Figura 9c e 9d).

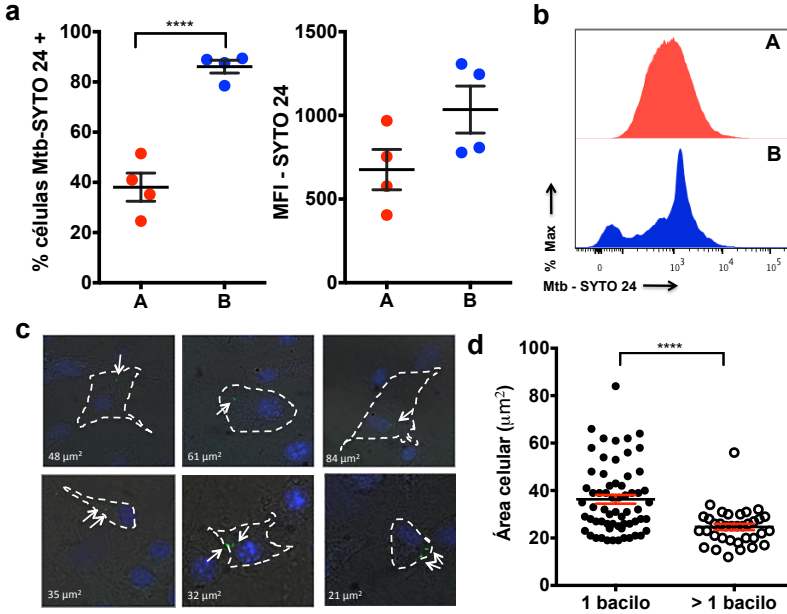


Figura 9: A subpopulação B fagocita mais Mtb do que subpopulação A. MMOs foram incubados com Mtb-SYTO 24 (MOI=30) durante 4 horas a 37°C. (a) Porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência de Mtb-SYTO 24. (b) Histograma representativo da intensidade de fluorescência de Mtb-SYTO 24 para população A e B. (c) Área celular de MMOs expostos à Mtb. (d) Microscopia de fluorescência de MMOs incubados com Mtb, aumento de 400x. Os resultados representam média ± E.P.M., onde cada ponto é representativo de um experimento independente, exceto em (c), na qual cada ponto é representativo de uma célula em um experimento. **** para $p < 0,0001$, teste t de Student bicaudal.

4.3. A SUBPOPULAÇÃO B INTERAGE MAIS COM O BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN (BCG).

A fim de descartar a possibilidade de que a marcação com o composto fluorescente SYTO 24 influencia os processos de adesão e fagocitose, utilizou-se BCG, a qual expressa uma proteína fluorescente vermelha (DsRed). Macrófagos derivados de medula óssea foram expostos à BCG DsRed por uma hora no gelo (adesão) ou por 4 horas a 37°C (fagocitose). A subpopulação B apresentou maior média de células positivas para BCG DsRed durante a adesão, 14% quando comparada a

subpopulação A, 1,7%. Na fagocitose, observou-se o mesmo fenômeno, a subpopulação B apresenta maior média de células positivas para BCG DsRed, 9,7% do que a A, 3,7% (Figura 10). Estes resultados sugerem que a marcação com SYTO 24 não influencia na maior ligação da subpopulação B a Mtb.

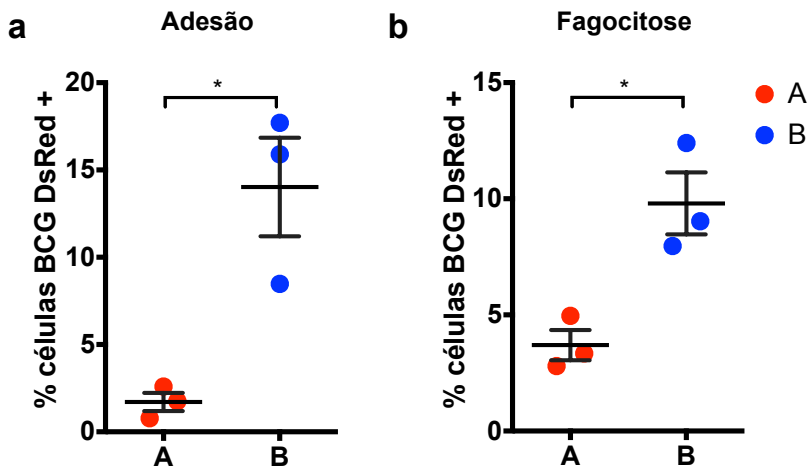
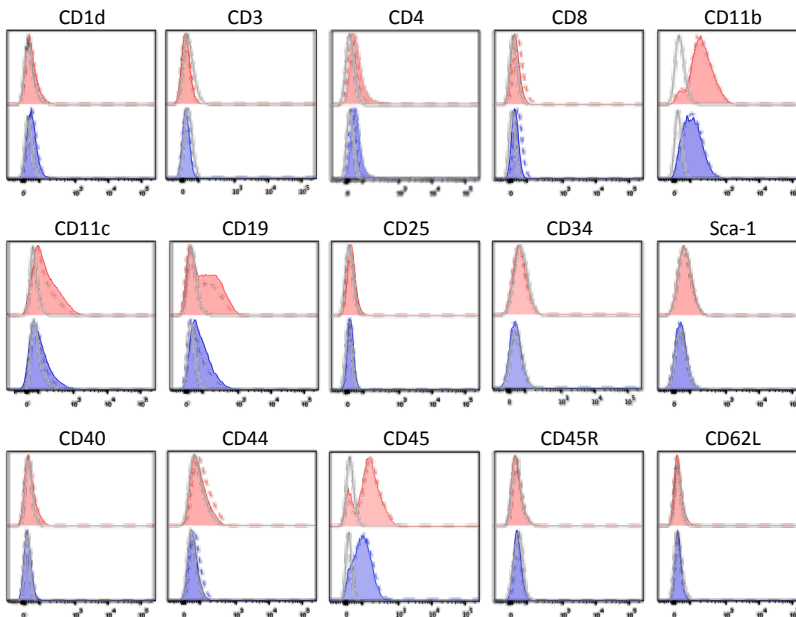


Figura 10: A subpopulação B adere e fagocita mais BCG DsRed do que subpopulação A. MMOs foram incubados com BCG DsRed (MOI=30) durante 1 hora no gelo (a) ou 4 horas a 37°C (b). (a) Porcentagem de células positivas para BCG DsRed durante a adesão (b) Porcentagem de células positivas para BCG DsRed durante a fagocitose. Os resultados representam média ± E.P.M., onde cada ponto é representativo de um experimento independente. * para $p < 0,05$, teste t de Student bicaudal.

4.4. A TRIAGEM DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE CELULAR REVELOU QUE A SUBPOPULAÇÃO B É CARACTERIZADA COMO $SSC^{LO}FSC^{LO}F4/80^{INT}CD11B^{INT}$.

A maior capacidade de interação da população B com micobactérias despertou interesse por possíveis moléculas de superfície presentes nesta população envolvidas neste processo. As moléculas de superfície celular foram identificadas por citometria de fluxo, todas as moléculas testadas estão listadas na Figura 11. Não houve diferença na expressão das moléculas de superfície entre os grupos não expostos e expostos à bactéria (Figura 11). Quando comparados com MMOS não marcados com anticorpos, estas células não apresentaram expressão de CD1d, CD3, CD4, CD8, CD25, CD34, CD40, CD44, CD45R, CD62L, CD69, CD80, CD107b, CD117, CD138, CD182, Ly6C/Ly6G, MHC classe II, NK1.1, Sca-1, TCR $\gamma\delta$. Enquanto que a expressão de CD11b, CD11c, CD19, CD45, CD86, CD88, CD107a, CD115, CD195, CD206, F4/80 e MHC classe I foram detectados nos macrófagos derivados de medula óssea (Figura 11).



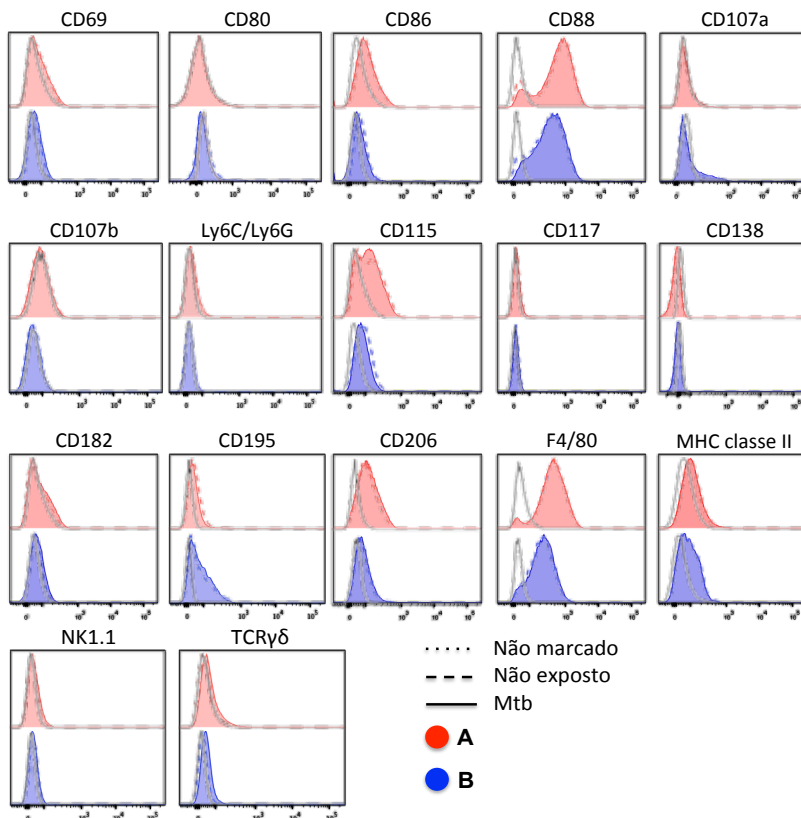
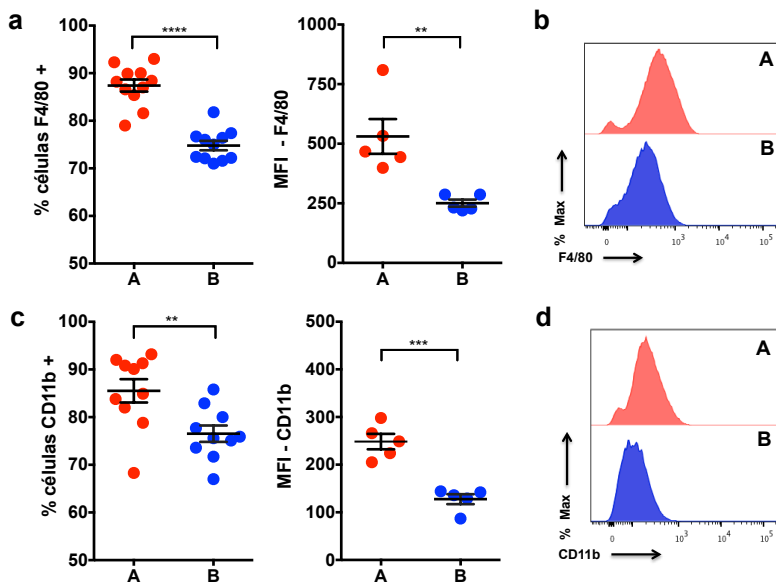


Figura 11: Triagem de moléculas de superfície de MMOs. MMOs foram expostos ou não a Mtb-SYTO 24 (MOI=30) durante uma hora no gelo, após esse período as células foram marcadas com anticorpos contra as moléculas de superfície por uma hora no gelo, depois lavadas e fixadas. Histogramas representativos da intensidade de fluorescência de cada molécula.

Com relação às moléculas de superfície clássicas de macrófagos, F4/80 e CD11b (SPRINGER *et al.*, 1979; AUSTYN e GORDON, 1981; REMOLD-O'DONNELL, 1988), a subpopulação B apresenta média de células positivas de 75% e 76% e intensidade de fluorescência 250 UA, 127 UA, respectivamente. Esses valores são menores em comparação com a subpopulação A que apresenta média de células positivas de 87% e 85% e intensidade de fluorescência 530 UA, 248 UA para F4/80 e

CD11b, respectivamente (Figura 12a, 12b, 12c, 12d). Dentre todas moléculas de superfícies testadas, as que se estão mais expressas na subpopulação B são apenas CD195 e CD107a. A população B apresenta média de 36% e 24% de células positivas para CD195 e CD107a, respectivamente, enquanto que a subpopulação A apresenta 4,7% e 12% de células positivas para as mesmas moléculas. Em relação a intensidade de fluorescência, a subpopulação B média de 53 UA e 221 UA para CD195 e CD107a, respectivamente, e a subpopulação A média de 29 UA e 157 para estas moléculas (Figura 12e, 12f, 12g, 12h).



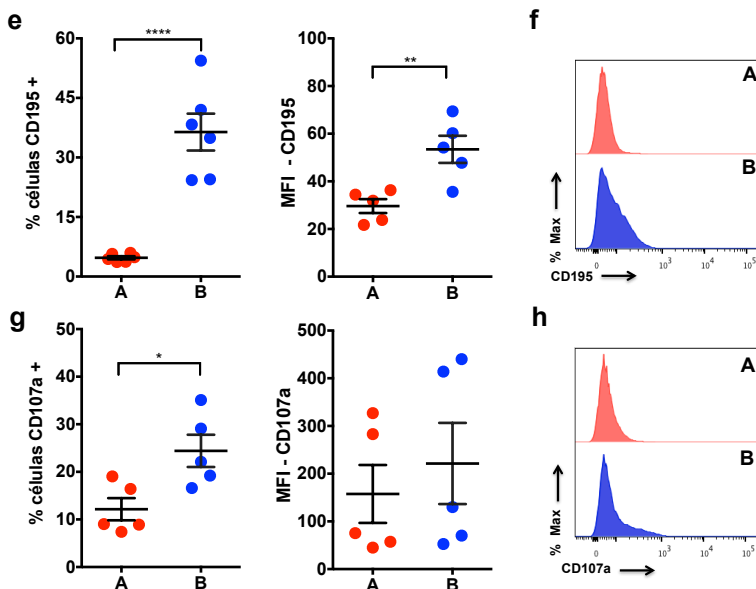


Figura 12: A subpopulação B é caracterizada como $SSC^{lo}FSC^{lo}F4/80^{int}CD11b^{int}$ e apresentam maior expressão de CD195 e CD107a quando comparada com a subpopulação A. MMOs foram expostos ou não a Mtb-SYTO 24 (MOI=30) durante uma hora no gelo, após esse período as células foram marcadas com anticorpos contra as moléculas de superfície por uma hora no gelo, depois lavadas e fixadas. (a,c,e,g) Porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência para F4/80, CD11b, CD195 e CD107a respectivamente. (b,d,f,h) Histograma representativo da intensidade de fluorescência de F4/80, CD11b, CD195 e CD107a respectivamente. Os resultados representam a média \pm E.P.M. onde cada ponto representa um experimento independente. * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, teste t de Student bicaudal.

4.5. A ADESÃO DE MTB À SUBPOPULAÇÃO B CORRELACIONA-SE COM A EXPRESSÃO DE CD195 E NÃO COM CD107A.

Devido a presença de mais células positivas para CD195 e CD107a na subpopulação B, foi investigado se a maior adesão a Mtb dentro dessa população estava associada a expressão destas moléculas. É possível observar que nas células negativas para Mtb a expressão 8,9% é

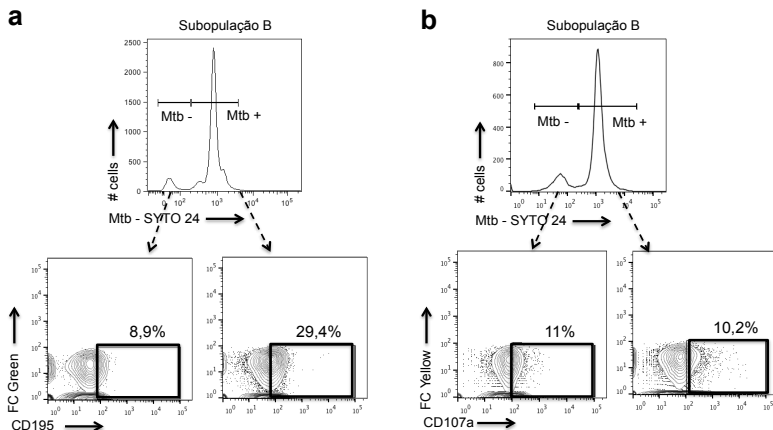


Figura 13: A maior adesão à Mtb na subpopulação B está correlacionada a CD195, mas não a CD107a. MMOs foram expostos Mtb-SYTO 24 (MOI=30) durante uma hora no gelo, após esse período as células foram marcadas com anticorpos contra as moléculas de superfície por uma hora no gelo, depois lavadas e fixadas. A subpopulação B foi separada em células Mtb negativas (-) e positivas (+) e os *gates* da expressão de CD195 e CD107a foram feitos de acordo com as células não marcadas com anticorpos. Os resultados são representativos de 5 experimentos independentes para CD195 e 1 experimento independente para CD107a.

4.6. CÉLULAS DE CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA CD195 APRESENTAM O MESMO PERFIL DE ADESÃO QUE CÉLULAS DE ANIMAIS SELVAGENS QUANDO EXPOSTOS À MTB

Visto que CD195 correlaciona com a maior adesão de Mtb, utilizou-se macrófagos derivados de medulas de camundongos nocautes (KO) para CD195 a fim de avaliar a participação deste receptor no processo. Na população A, obteve-se 50% de células selvagens (WT) positivas para Mtb e 46% de células CD195 KO positivas para Mtb. Na população B, a porcentagem de células positivas foi de 79% e 81%, para células WT e CD195 KO, respectivamente (Figura 14). Com relação a intensidade de fluorescência, o total de células WT e CD195 KO apresentaram 518 UA e 495 UA, respectivamente. Ainda, a população A apresentou 494 UA para células WT e 466 UA para células CD195 KO e a população B 1261 UA para WT e 1302 UA para CD195 KO (Figura

14). Estes dados indicam que CD195 não participa na adesão de Mtb a macrófagos derivado de medula óssea.

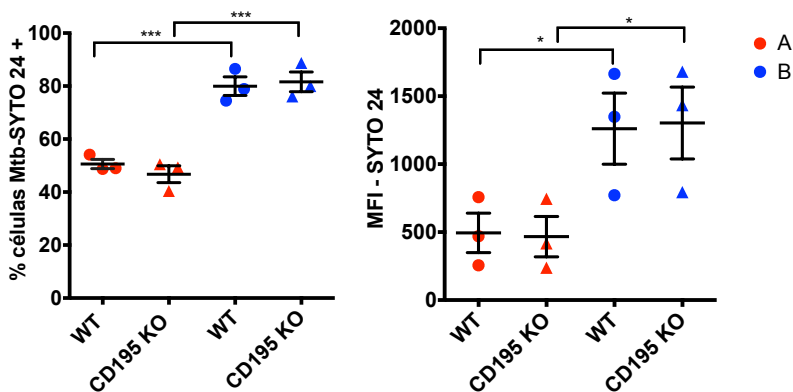


Figura 14: Células CD195 KO apresentam mesmo perfil de adesão de células WT. MMOs de camundongos WT ou CD195 KO foram expostos Mtb-SYTO 24 (MOI=30) durante uma hora no gelo. Porcentagem de células positivas e intensidade de fluorescência de Mtb-SYTO 24. Os círculos representam as células WT e os triângulos células CD195 KO. Os resultados representam a média ± E.P.M. onde cada ponto representa um experimento independente. * para $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, teste t de Student bicaudal.

4.7. CINÉTICA DE DIFERENCIAÇÃO DOS MACRÓFAGOS DE MEDULA ÓSSEA.

Devido ao menor tamanho e complexidade da população B (Figura 6a), a menor expressão de F4/80, CD11b (Figura 12a,b,c,d), assim como a menor expressão de CD45, CD86, CD115, CD206 e MHC classe II (Figura 11) gerou-se a hipótese de que a subpopulação B é uma população mais imatura do que a subpopulação A. Assim, o estágio de maturação da célula poderia estar envolvido com maior adesão encontrada nestas células. Desta forma, foram coletadas células da cultura de medula óssea durante os dias 0, 3, 5, 7 e 10 de diferenciação. Durante todos os dias coletados, foi possível identificar as subpopulações A e B com base nos parâmetros FSC vs SSC (Figura 15a) utilizados previamente (Figura 6). Observou-se um aumento na frequência dos eventos correspondentes à subpopulação A e um decréscimo da subpopulação B (Figura 15b). No dia 3 estas

subpopulações apresentam frequência média de 37,8% e 26%, no dia 5, 53% e 17%, no dia 7, 65% e 13% e no dia 10, 73% e 6%, respectivamente para população A e B (Figura 15b). Em relação a adesão à Mtb, a subpopulação B aumenta a associação à Mtb conforme o tempo enquanto que a subpopulação A diminui. No dia 3, a média de células positivas para Mtb-SYTO24 é de 51,5 % e 30,5% , no dia 5, 28% e 16%, no dia 7, 32% e 85% e no dia 10, 6% e 75% (Figura 15c). Este aumento da adesão bacteriana, na subpopulação B foi observado a partir do dia 7, o que sugere a existência de um programa celular específico nesta subpopulação que pode ser responsável pela maior adesão de Mtb aos macrófagos murinos.

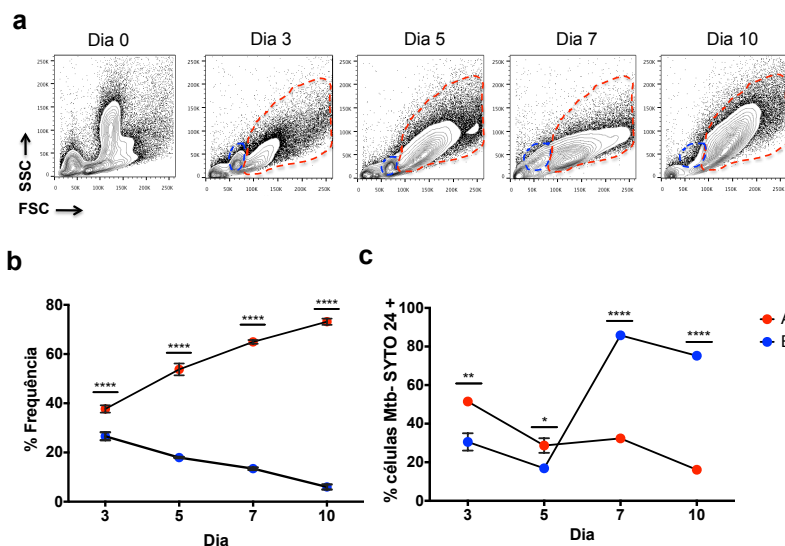


Figura 15: Cinética de diferenciação e adesão dos MMOs à Mtb das subpopulações A e B. Células foram coletadas nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 de diferenciação e expostas à Mtb-SYTO24 (MOI=30) durante uma hora no gelo. (a) Gráficos em contorno, *contour plots*, dos dias 0, 3, 5, 7 e 10, em destaque a população B em azul e A em vermelho. (b) Porcentagem da frequência das subpopulações A e B conforme os dias de diferenciação. (c) Porcentagem de células Mtb-SYTO24+ das subpopulações A e B conforme os dias de diferenciação. Os resultados representam a média \pm E.P.M. onde cada ponto representa um experimento independente. * para $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$, ANOVA de duas vias, seguido de teste de Sidak.

Para estudar com mais detalhes o processo de amadurecimento das duas subpopulações estudadas, as moléculas de superfície F4/80, CD11b, CD117, CD34 e Sca-1, previamente implicados no desenvolvimento celular de macrófagos foram avaliadas em células de medula de óssea após a exposição ao sobrenadante de células L929 (HIRSCH *et al.*, 1981; SPANGRUDE *et al.*, 1988; KRAUSE *et al.*, 1994; GOODELL *et al.*, 1996). A expressão de F4/80 aumenta conforme os dias para as duas populações. A porcentagem de células positivas para F4/80, no dia 0 é de 19,9% e nas subpopulações A e B é respectivamente, no dia 3, 45,5% e 10,8%, no dia 5 89% e 24,2%, no dia 7, 91% e 79% e no dia 10, 92% e 80% (Figura 16a). Em relação ao CD11b, a expressão também aumenta conforme os dias, o total no dia 0 é de 33,1% de células positivas para CD11b, já as subpopulações A e B exibiram respectivamente, no dia 3, 64% e 44,7%, no dia 5, 87% e 72%, no dia 7, 93% e 74% e no dia 10, 92% e 80,6% (Figura 16b). As células CD34⁺ CD117⁺ Sca-1⁺ estavam presentes, no dia 0 em 3,99% do total da população de MMOs, já no dia 3, 1,93% e 0,64%, no dia 5, 0,63% e 0,40%, no dia 7 0,086% e 0,015% e no dia 10 0,092% e 0,003% das subpopulações A e B, respectivamente (Figura 16c).

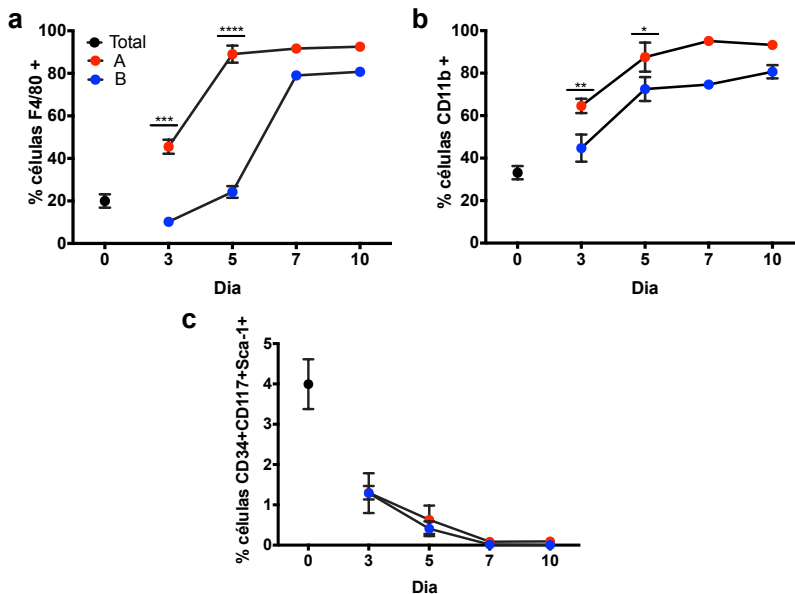


Figura 16: Cinética da porcentagem de células $F4/80^+$, $CD11b^+$ e $CD34^+CD117^+Sca1^+$. Células foram coletadas nos dias 0, 3, 5, 7 e 10 de diferenciação e expostas à Mtb-SYTO24 (MOI=30) durante uma hora no gelo. (a) Cinética da porcentagem de células $F4/80^+$ (b) Cinética da porcentagem de células $CD11b^+$ (c) Cinética da porcentagem de células $CD34^+CD117^+Sca1^+$. Os resultados representam a média \pm E.P.M. * para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, ANOVA de duas vias, seguido de teste de Sidak.

5. DISCUSSÃO

Foi mostrado neste trabalho duas populações de macrófagos derivados de medula óssea que inicialmente se revelaram diferentes em tamanho, complexidade e na frequência em que aparecem na cultura celular, essas populações foram denominadas A e B. Na literatura, um grupo que estudava diferenciação de macrófagos de medula óssea após criopreservação, observou também duas populações, chamadas G1 e G2, em que G1 é uma população menor e menos frequente e G2, maior e mais frequente (MARIM *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que existem macrófagos pequenos e grandes em peritônio de camundongos, sendo que os grandes também aparecem em maior porcentagem que os pequenos (GHOSN *et al.*, 2010). Outros trabalhos tratam as populações de macrófagos murinos como única, além disso as comparações existentes são feitas entre macrófagos de origem distintas ou entre células aderentes e não aderentes (ALEXANDER e SMITH, 1978; WALKER *et al.*, 1985; GJOMARKAJ *et al.*, 1999; NOSS *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2006; BOWDISH *et al.*, 2009; FRANCKE *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013). Em humanos, há evidências de macrófagos alveolares pequenos e grandes, onde os pequenos também são minoria neste caso, esses macrófagos foram encontrados em indivíduos saudáveis e doentes (FRANKENBERGER *et al.*, 2004; WRIGHT *et al.*, 2009; GARRATT *et al.*, 2012; JAMBO *et al.*, 2014).

Além das diferenças nas características de tamanho em relação a população A, a população B apresentou uma maior interação com *Mtb*, evidenciado nos ensaios de adesão e fagocitose, e demonstrado por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência. Na microscopia de fluorescência é possível sugerir que as células com área celular menor são representativas da população B, na citometria de fluxo, devido ao seu tamanho e a quantidade de bacilos associado a essas células. Ghosn *et al.* (2010) mostrou, por citometria de fluxo, que os macrófagos pequenos do peritônio fagocitam mais *Escherichia coli* do que os macrófagos grandes. Esse dado reforça a idéia de que macrófagos menores tem maior atividade fagocítica. Além disso, Jambo *et al.* (2014) relataram que os macrófagos alveolares menores, encontrados em humanos, são mais infectados pelo vírus HIV, porém estas células tem atividade fagocítica prejudicada. Marim *et al.* (2010), os quais observaram também duas populações em macrófagos de medula óssea, não analisaram diferenças funcionais das mesmas, apenas a expressão de moléculas de superfície.

Os experimentos utilizando BCG DsRed reforçam o resultado que a população B apresenta maior capacidade de interação com micobactérias quando comparada com A. Além disso, a expressão genética uma proteína fluorescente da BCG, mostra que a marcação com SYTO 24 não altera o perfil de adesão ou fagocitose. Estudos mostram que não há diferença na fagocitose de BCG e Mtb (BAND *et al.*, 1986; SILVER *et al.*, 1998) , portanto a menor porcentagem de células positivas nesses processos, pode ser explicada pelo fato de que os estoques BCG DsRed são congelados enquanto que a Mtb utilizada para os experimentos são provenientes diretamente do meio sólido, apresentando assim um melhor *fitness* para a infecção.

A maior interação dessa população, menor e menos frequente, com Mtb despertou interesse para possíveis moléculas de superfície que facilitassem a comunicação entre bacilo e célula. Foi feita uma triagem com anticorpos contra diversos antígenos de superfície a fim de caracterizar as populações macrófagos e identificar possíveis alvos na população B. O fato de não haver diferença entre os grupos não expostos ou expostos a Mtb indica que essas moléculas já existiam previamente na população e que a incubação de uma hora no gelo com Mtb não alterou a dinâmica das mesmas. Os MMOs não apresentaram expressão de CD1d, CD3, CD4, CD8, CD25, CD34, CD40, CD44, CD45R, CD62L, CD69, CD80, CD107b, CD117, CD138, CD182, Ly6C/Ly6G, NK1.1, Sca-1 e TCR $\gamma\delta$. A expressão de alguns destas moléculas não era esperada em macrófagos, pois são encontradas em outros tipos celulares como células T (CD3, CD4, CD8, TCR $\gamma\delta$), células B (CD45R, CD138), células NK (CD69, NK1.1) e células tronco hematopoiéticas (CD34, CD117, Sca-1).

Apesar de não ser encontrada nos MMOs deste trabalho, a presença de CD1, CD25, CD40, CD44, CD62L, CD80, CD107b, CD182, Ly6C/Ly6G em macrófagos é reportada na literatura (HO e SPRINGER, 1983; MARIM *et al.*, 2010; FRANCKE *et al.*, 2011; KAWASAKI *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; MORGADO *et al.*, 2014). Essas diferenças na expressão desses marcadores pode ser provocada pelos diferentes protocolos de geração de macrófagos de medula óssea, os quais podem variar em meio utilizado (DMEM, RPMI 1640), estímulo para diferenciação e suas concentrações (GM-CSF, M-CSF, sobrenadante de células L929), duração da diferenciação (5 a 7 dias), densidade celular e a linhagem do camundongo (C57BL/6J ou BALB/C) (LEE e HU, 2013; MURRAY *et al.*, 2014). Por outro lado, CD11b, CD11c, CD45, CD86, CD88, CD115, CD195, CD107a, CD206, F4/80 e MHC classe II foram expressos na superfície de MMOs, estes

marcadores já se mostraram presentes em macrófagos de estudos prévios (NORBURY *et al.*, 1995; NOSS *et al.*, 2000; FRANCKE *et al.*, 2011; DALLI *et al.*, 2012; DUNKELBERGER *et al.*, 2012; MIN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; DAS *et al.*, 2014). A presença inesperada de CD19 nestes macrófagos também foi encontrada, em humanos, por um grupo, o qual chamaram esses macrófagos de “*B-macrophages*” (MONTECINO-RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

Ao final da triagem, a subpopulação B foi caracterizada como SSC^{lo}FSC^{lo}F4/80^{int}CD11b^{int}. As moléculas F4/80 e CD11b são características de macrófagos murinos (SPRINGER *et al.*, 1979; AUSTYN e GORDON, 1981; MCKNIGHT *et al.*, 1996; GONZALEZ-JUARRERO *et al.*, 2003; BAIN *et al.*, 2014), a subpopulação B, a qual tem maior interação com Mtb, mostrou uma expressão intermediária destas moléculas quando comparada com a população A. O F4/80 é um antígeno de superfície que possui sete domínios transmembrânicos e um domínio extracelular de múltiplos módulos EGF (*epidermal growth factor*) (MCKNIGHT *et al.*, 1996), ele está classificado em uma subfamília de receptores acoplados à proteína G (RAPG), chamada de RAPG de adesão (BJARNADOTTIR *et al.*, 2007). Sobre a função de F4/80, há evidências de que esta molécula participa da tolerância periférica, além disso animais nocautes para F4/80 mostraram desenvolvimento normal de macrófagos teciduais e reposta antimicrobiana igual aos animais selvagens após infecção com *Listeria monocytogenes* (SCHALLER *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2005). Com relação a micobactérias, já foi demonstrado que a infecção com BCG diminui a expressão de F4/80 em macrófagos, porém dados que mostram o papel desta na molécula na adesão a Mtb são escassos (EZEKOWITZ e GORDON, 1982; HAMERMAN e ADEREM, 2001). Já CD11b, também conhecido como receptor do complemento 3 (CR3), é uma glicoproteína heterodimérica de membrana, a qual tem função na adesão celular e fagocitose de microrganismos, incluindo Mtb (SANCHEZ-MADRID *et al.*, 1983; EGWANG *et al.*, 1984; EZEKOWITZ *et al.*, 1984; MOSSER e EDELSON, 1985; CORBI *et al.*, 1987; HICKSTEIN *et al.*, 1987; REMOLD-O'DONNELL e SAVAGE, 1988; SCHLESINGER *et al.*, 1990).

Além disso, de todos as moléculas testadas apenas CD195 e CD107a estavam mais expressas na população B que na A. O CD195 também é conhecido como CCR5, receptor C-C de quimiocina 5, é um receptor acoplado à proteína G, possui sete domínios transmembrânicos e tem como ligantes MIP (*macrophage inflammatory protein*)-1 α , MIP-1 β , RANTES (*regulated on activation normal T cell expressed and*

secreted) e a glicoproteína de envelope do vírus da imunodeficiência humana, gp120 (SAMSON *et al.*, 1996; FARZAN *et al.*, 1999). (SCHALL *et al.*, 1990; KUNA *et al.*, 1992; SCHALL *et al.*, 1993; COCCHI *et al.*, 1995; DRAGIC *et al.*, 1996; DAIRAGHI *et al.*, 1998). Já o CD107a é conhecido como LAMP (*lysosome associated membrane protein*)-1 e é uma glicoproteína, foi primeiramente demonstrada como uma proteína intracelular, associada às membranas dos lisossomos (CHEN, MURPHY, *et al.*, 1985; CHEN, PAN, *et al.*, 1985). Apesar disto, existem relatos na literatura da presença de LAMP-1 na superfície de monócitos e linfócitos T CD8+, onde está envolvido com ativação e adesão celular (KANNAN *et al.*, 1996; BETTS *et al.*, 2003). Na literatura a relação entre LAMP-1 e Mtb está associada à maturação de fagossomos após a exposição ao bacilo, dados que mostram LAMP-1 diretamente relacionado com a adesão de Mtb à células são escassos (STURGILL-KOSZYCKI *et al.*, 1994; XU *et al.*, 1994; TORRES *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2015).

Devido a maior presença de CD195 e CD107a na subpopulação B, estas moléculas foram consideradas possíveis alvos para a interação entre MMOs e Mtb. Porém, quando a análise foi feita dentro da subpopulação B, as células que tinham maior associação com Mtb eram as células que expressavam mais CD195, enquanto que a expressão de CD107a não se altera entre células que tem mais ou menos interação com Mtb, este fato direcionou a nossa atenção para CD195. Em 2005, foi demonstrado que CD195 poderia formar heterodímeros com CD88, receptor de C5a (C5aR), uma molécula que está expressa em 77% da subpopulação B, praticamente a mesma porcentagem de Mtb associado a ela, 74%. Entretanto, a população A também 69% de CD88, mas tem apenas 42% de associação a Mtb (HUTTENRAUCH *et al.*, 2005). A partir deste fato foi hipotetizado que a heterodimerização de CD195, o qual está presente na subpopulação B, com CD88 poderia levar à uma alteração de conformação de CD88 e consequente aumento da associação da subpopulação B com Mtb. Além disso, trabalhos mostram que CD88 é um receptor participante da imunidade no pulmão, e que macrófagos primados com Mtb, estimulam células T a expressar mais CD88 (HOPKEN *et al.*, 1996; CONNELLY *et al.*, 2007). Porém, MMOs derivados de camundongos nocautes para este receptor apresentaram a mesma quantidade de associação à Mtb do que os MMOs derivados de camundongos selvagens (dados preliminares não apresentados).

Visto que a ausência de CD88 não influencia na interação entre a subpopulação B e Mtb, foi investigada o possível envolvimento de

CD195 com o processo de adesão de Mtb. Na literatura, esta interação foi estudada *in vivo*, onde camundongos nocautes para esse receptor controlam a infecção causada por Mtb, porém apresentam aumento no infiltrado linfocítico no pulmão (SCOTT ALGOOD e FLYNN, 2004). Ainda, esta interação também foi estudada *in vitro*, onde a infecção com Mtb aumenta a expressão de CCR5 em macrófagos; e em células dendríticas foi mostrado que CD195 reconhece a proteína Hsp70 micobacteriana e portanto poderia agir como um receptor de reconhecimento de padrões (FLOTO *et al.*, 2006; DAS *et al.*, 2014). Levando em conta os dados apresentados e os da literatura, foi investigado se CD195 participa do aumento da adesão da subpopulação B a Mtb, para isso foram utilizados MMOs derivados de camundongos nocautes para CD195. Contudo, a adesão de Mtb à subpopulação B em células nocautes se mostrou igual a adesão em células selvagens. Portanto, essa característica da subpopulação B não é dependente de CD88 ou CD195, outras moléculas de superfície presentes nesta população e não testados neste trabalho podem ser responsáveis pelo aumento da adesão. Por exemplo, os receptores do tipo *scavenger*, já foram mostrados na literatura como possíveis alvos de Mtb (SCHAFER *et al.*, 2009; HAWKES *et al.*, 2010; SEVER-CHRONEOS *et al.*, 2011), assim como os receptores do tipo toll que também estão envolvidos no reconhecimento de Mtb (UNDERHILL *et al.*, 1999; MEANS *et al.*, 2001; BAFICA *et al.*, 2005). Além desses, há evidências que os receptores *mincle* participem do reconhecimento micobacteriano (ISHIKAWA *et al.*, 2009; BEHLER *et al.*, 2012). Embora, estudos mostram que os receptores de manose (CD206), receptor do complemento 3 (CD11b), receptor do complemento 4 (CD11c) e CD44 também participam da interação com micobactérias, estes marcadores estavam mais expressos na população A do que na B, portanto não foram associados com o aumento da adesão desta população ao bacilo (SCHLESINGER *et al.*, 1990; SCHLESINGER, 1993; LEEMANS *et al.*, 2003; ROOYAKKERS e STOKES, 2005). Ademais, essa interação elevada possa talvez ser mediada por outros receptores ainda não descritos como participantes da interação com Mtb, e por receptores que não sejam de reconhecimento de padrões, pois levam a ativação de vias antimicrobianas, desfavorecendo o patógeno. Talvez a utilização deste(s) outro(s) receptor(es) presente(s) nesta população pode conferir a Mtb uma maior chance de sobrevivência. Apesar de não estarem envolvidas na interação com Mtb, as moléculas CD195 e CD107a podem ser utilizadas como identificadoras dessa subpopulação em outros contextos.

Uma hipótese alternativa é a existência de uma maior interação física entre a subpopulação B dos macrófagos e *Mtb*. Já foi demonstrado que macrófagos peritoniais e *Mtb* apresentam carga negativa, -12,49 mV e -22,6 mV, respectivamente, estas cargas foram medidas pelo potencial zeta em pH fisiológico (SILVA FILHO *et al.*, 1987; AYALA-TORRES *et al.*, 2013). Além disso, foi mostrado que conforme o diâmetro de partículas hidrofóbicas aumenta, a carga negativa da partícula também aumenta (TABATA e IKADA, 1988). Portanto, é possível que a subpopulação A, devido ao seu maior tamanho, tenha mais carga negativa em sua superfície e repila *Mtb*, enquanto que a subpopulação B, por ter menor tamanho, apresente menos cargas negativas em sua superfície, facilitando o contato com a bactéria.

Outra hipótese gerada é de que a subpopulação B é uma população mais imatura derivada das células de medula óssea e que o estágio de maturação poderia estar envolvido neste fenômeno. Esta idéia baseia-se no fato da subpopulação B ser menor, menos complexa e apresentar menor expressão dos marcadores de superfície celular F4/80, CD11b, CD45, CD86, CD115, CD206 e MHC classe II em comparação a subpopulação A. Apesar de não haver diferenças entre as porcentagens de células progenitoras presentes, é possível observar a menor expressão de F4/80 e CD11b na subpopulação B do que na A, principalmente durante os dias 3 e 5 de diferenciação. Estes dados indicam que a subpopulação B é mais imatura, devido ao fato de que F4/80 é considerado um marcador de maturação de macrófagos e que outros trabalhos também relacionam a menor expressão de F4/80 e CD11b com um estágio mais imaturo de macrófagos (HIRSCH *et al.*, 1981; HUSSAIN e STOHLMAN, 2012; ZASLONA *et al.*, 2012). Além disso, a frequência da subpopulação A aumenta conforme o tempo de diferenciação enquanto a subpopulação B diminui. É possível que células da subpopulação B se diferenciem e aumentem de tamanho, apresentando características da subpopulação A. Há evidências na literatura que mostram que tímócitos, células dendríticas, linfócitos B e macrófagos imaturos são preferencialmente infectados por diferentes patógenos (DAVIES *et al.*, 1988; VACHERON *et al.*, 2002; OKAMOTO *et al.*, 2012). Ainda, outro trabalho mostrou que *Mtb* inibe a maturação de células dendríticas humanas, indicando que este um estado celular mais imaturo talvez possa favorecer a bactéria (HANEKOM *et al.*, 2003). Durante a maturação dos macrófagos, a adesão ao bacilo da subpopulação A diminui conforme os dias, indicando que nesta subpopulação o estágio mais imaturo favorece a adesão da bactéria. Contudo, na subpopulação B o oposto é observado,

conforme ocorre a maturação a adesão aumenta e um pico na adesão foi observado a partir do dia 7. Isto mostra que na subpopulação B o estágio de maturação não parece ser o responsável pelo aumento de adesão. Desta forma, é possível que a molécula de superfície responsável pelo aumento da adesão tenha seu pico de expressão entre os dias 5 e 7 de diferenciação, assim como acontece com a expressão de F4/80. Além disso, este pico de adesão bacteriana pode sugerir a existência de um programa celular específico desta subpopulação, apresentando um processo de diferenciação distinto da subpopulação A, o qual pode ser o responsável pela maior adesão de Mtb aos macrófagos.

O presente trabalho identificou uma subpopulação $SSC^{lo}FSC^{lo}F4/80^{int}CD11b^{int}$ de macrófagos diferenciados *in vitro*, a qual apresenta uma capacidade aumentada de adesão e fagocitose de Mtb, independente de CD195. Estes dados geraram a hipótese de que no contexto da infecção por Mtb a subpopulação B representa um nicho para a replicação bacteriana sendo responsável pela disseminação do bacilo *in vivo*.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho identificou uma subpopulação SSC^{lo}FSC^{lo}F4/80^{int}CD11b^{int} de macrófagos diferenciados *in vitro*, a qual apresenta uma capacidade aumentada de adesão e fagocitose de Mtb, independente de CD195.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, V.; BADELL, E.; DOUILLARD, P.; ENSERGUEIX, D.; LEENEN, P. J.; TANGUY, M.; FIETTE, L.; SAELAND, S.; GICQUEL, B.; WINTER, N. Neutrophils rapidly migrate via lymphatics after *Mycobacterium bovis* BCG intradermal vaccination and shuttle live bacilli to the draining lymph nodes. *Blood*, v. 106, n. 5, p. 1843-50, Sep 1 2005.

ALEXANDER, J.; SMITH, C. C. Growth of *Mycobacterium lepraemurium* in nonstimulated and stimulated mouse peritoneal-derived and bone marrow-derived macrophages in vitro. *Infect Immun*, v. 22, n. 3, p. 631-6, Dec 1978.

ANAND, R. J.; GRIBAR, S. C.; LI, J.; KOHLER, J. W.; BRANCA, M. F.; DUBOWSKI, T.; SODHI, C. P.; HACKAM, D. J. Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1 α -dependent manner. *J Leukoc Biol*, v. 82, n. 5, p. 1257-65, Nov 2007.

ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med*, v. 142, n. 1, p. 1-16, Jul 1 1975.

ASSELINÉAU, J.; LEDERER, E. Structure of the mycolic acids of *Mycobacteria*. *Nature*, v. 166, n. 4227, p. 782-3, Nov 4 1950.

AUSTYN, J. M.; GORDON, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, v. 11, n. 10, p. 805-15, Oct 1981.

AYALA-TORRES, C.; HERNÁNDEZ, N.; GALEANO, A.; NOVOA-APONTE, L.; SOTO, C.-Y. Zeta potential as a measure of the surface charge of mycobacterial cells. *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 1189-1195, 2013.

BAFICA, A.; SCANGA, C. A.; FENG, C. G.; LEIFER, C.; CHEEVER, A.; SHER, A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*, v. 202, n. 12, p. 1715-24, Dec 19 2005.

BAIN, C. C.; BRAVO-BLAS, A.; SCOTT, C. L.; GOMEZ PERDIGUERO, E.; GEISSMANN, F.; HENRI, S.; MALISSEN, B.; OSBORNE, L. C.; ARTIS, D.; MOWAT, A. M. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol*, v. 15, n. 10, p. 929-37, Oct 2014.

BAND, A. H.; BHATTACHARYA, A.; TALWAR, G. P. Lack of Mycobacterium leprae-specific uptake in Schwann cells. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 54, n. 1, p. 71-8, Mar 1986.

BEHLER, F.; STEINWEDE, K.; BALBOA, L.; UEBERBERG, B.; MAUS, R.; KIRCHHOF, G.; YAMASAKI, S.; WELTE, T.; MAUS, U. A. Role of Mincle in alveolar macrophage-dependent innate immunity against mycobacterial infections in mice. *J Immunol*, v. 189, n. 6, p. 3121-9, Sep 15 2012.

BERTHRONG, M. Biology of the mycobacterioses. The macrophage-tubercle bacillus relationship and resistance to tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci*, v. 154, n. 1, p. 157-66, Sep 5 1968.

BETTS, M. R.; BRENCHELEY, J. M.; PRICE, D. A.; DE ROSA, S. C.; DOUEK, D. C.; ROEDERER, M.; KOUP, R. A. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*, v. 281, n. 1-2, p. 65-78, Oct 1 2003.

BJARNADOTTIR, T. K.; FREDRIKSSON, R.; SCHIOTH, H. B. The adhesion GPCRs: a unique family of G protein-coupled receptors with important roles in both central and peripheral tissues. *Cell Mol Life Sci*, v. 64, n. 16, p. 2104-19, Aug 2007.

BOLTZ-NITULESCU, G.; WILTSCHKE, C.; HOLZINGER, C.; FELLINGER, A.; SCHEINER, O.; GESSL, A.; FORSTER, O. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *J Leukoc Biol*, v. 41, n. 1, p. 83-91, Jan 1987.

BOWDISH, D. M.; SAKAMOTO, K.; KIM, M. J.; KROOS, M.; MUKHOPADHYAY, S.; LEIFER, C. A.; TRYGGVASON, K.; GORDON, S.; RUSSELL, D. G. MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose

dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*. ***PLoS Pathog***, v. 5, n. 6, p. e1000474, Jun 2009.

BRANDT, F. A.; LLOYD, D. L. Differential staining for *M. tuberculosis* and *M. leprae*; a modification of the Ziehl-Neelsen stain. ***Lab Invest***, v. 3, n. 4, p. 296-302, Jul-Aug 1954.

BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. ***Annu Rev Biochem***, v. 64, p. 29-63, 1995.

BURGESS, A. W.; CAMAKARIS, J.; METCALF, D. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. ***J Biol Chem***, v. 252, n. 6, p. 1998-2003, Mar 25 1977.

CAILHIER, J. F.; PARTOLINA, M.; VUTHOORI, S.; WU, S.; KO, K.; WATSON, S.; SAVILL, J.; HUGHES, J.; LANG, R. A. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. ***J Immunol***, v. 174, n. 4, p. 2336-42, Feb 15 2005.

CAMPBELL, P. A.; CANONO, B. P.; DREVETS, D. A. Measurement of bacterial ingestion and killing by macrophages. ***Curr Protoc Immunol***, v. Chapter 14, p. Unit 14 6, May 2001.

CARLIN, L. M.; STAMATIADIS, E. G.; AUFRAY, C.; HANNA, R. N.; GLOVER, L.; VIZCAY-BARRENA, G.; HEDRICK, C. C.; COOK, H. T.; DIEBOLD, S.; GEISSMANN, F. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. ***Cell***, v. 153, n. 2, p. 362-75, Apr 11 2013.

CECCHINI, M. G.; HOFSTETTER, W.; HALASY, J.; WETTERWALD, A.; FELIX, R. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. ***Mol Reprod Dev***, v. 46, n. 1, p. 75-83; discussion 83-4, Jan 1997.

CHACON-SALINAS, R.; SERAFIN-LOPEZ, J.; RAMOS-PAYAN, R.; MENDEZ-ARAGON, P.; HERNANDEZ-PANDO, R.; VAN SOOLINGEN, D.; FLORES-ROMO, L.; ESTRADA-PARRA, S.; ESTRADA-GARCIA, I. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium*

tuberculosis genotypes. *Clin Exp Immunol*, v. 140, n. 3, p. 443-9, Jun 2005.

CHATTERJEE, D.; HUNTER, S. W.; MCNEIL, M.; BRENNAN, P. J. Lipoarabinomannan. Multiglycosylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *J Biol Chem*, v. 267, n. 9, p. 6228-33, Mar 25 1992.

CHATTERJEE, D.; LOWELL, K.; RIVOIRE, B.; MCNEIL, M. R.; BRENNAN, P. J. Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem*, v. 267, n. 9, p. 6234-9, Mar 25 1992.

CHEN, J. W.; MURPHY, T. L.; WILLINGHAM, M. C.; PASTAN, I.; AUGUST, J. T. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J Cell Biol*, v. 101, n. 1, p. 85-95, Jul 1985.

CHEN, J. W.; PAN, W.; D'SOUZA, M. P.; AUGUST, J. T. Lysosome-associated membrane proteins: characterization of LAMP-1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 cultured cells. *Arch Biochem Biophys*, v. 239, n. 2, p. 574-86, Jun 1985.

CHEUNG, D. O.; HALSEY, K.; SPEERT, D. P. Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, v. 68, n. 8, p. 4585-92, Aug 2000.

CHORRO, L.; SARDE, A.; LI, M.; WOOLLARD, K. J.; CHAMBON, P.; MALISSEN, B.; KISSENPFENNIG, A.; BARBAROUX, J. B.; GROVES, R.; GEISSMANN, F. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*, v. 206, n. 13, p. 3089-100, Dec 21 2009.

CHOW, A.; LUCAS, D.; HIDALGO, A.; MENDEZ-FERRER, S.; HASHIMOTO, D.; SCHEIERMANN, C.; BATTISTA, M.; LEBOEUF, M.; PROPHETE, C.; VAN ROOIJEN, N.; TANAKA, M.; MERAD, M.; FRENETTE, P. S. Bone marrow CD169⁺ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*, v. 208, n. 2, p. 261-71, Feb 14 2011.

COCCHI, F.; DEVICO, A. L.; GARZINO-DEMO, A.; ARYA, S. K.; GALLO, R. C.; LUSSO, P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, v. 270, n. 5243, p. 1811-5, Dec 15 1995.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E., 3RD; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, v. 393, n. 6685, p. 537-44, Jun 11 1998.

CONNELLY, M. A.; MOULTON, R. A.; SMITH, A. K.; LINDSEY, D. R.; SINHA, M.; WETSEL, R. A.; JAGANNATH, C. *Mycobacteria*-primed macrophages and dendritic cells induce an up-regulation of complement C5a anaphylatoxin receptor (CD88) in CD3+ murine T cells. *J Leukoc Biol*, v. 81, n. 1, p. 212-20, Jan 2007.

CORBI, A. L.; MILLER, L. J.; O'CONNOR, K.; LARSON, R. S.; SPRINGER, T. A. cDNA cloning and complete primary structure of the alpha subunit of a leukocyte adhesion glycoprotein, p150,95. *EMBO J*, v. 6, n. 13, p. 4023-8, Dec 20 1987.

DA SILVA, R. P.; HALL, B. F.; JOINER, K. A.; SACKS, D. L. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol*, v. 143, n. 2, p. 617-22, Jul 15 1989.

DAHER EDE, F.; DA SILVA, G. B., JR.; BARROS, E. J. Renal tuberculosis in the modern era. *Am J Trop Med Hyg*, v. 88, n. 1, p. 54-64, Jan 2013.

DAIRAGHI, D. J.; FRANZ-BACON, K.; CALLAS, E.; CUPP, J.; SCHALL, T. J.; TAMRAZ, S. A.; BOEHME, S. A.; TAYLOR, N.;

BACON, K. B. Macrophage inflammatory protein-1 β induces migration and activation of human thymocytes. *Blood*, v. 91, n. 8, p. 2905-13, Apr 15 1998.

DALLI, J.; JONES, C. P.; CAVALCANTI, D. M.; FARSKY, S. H.; PERRETTI, M.; RANKIN, S. M. Annexin A1 regulates neutrophil clearance by macrophages in the mouse bone marrow. *FASEB J*, v. 26, n. 1, p. 387-96, Jan 2012.

DAS, S.; BANERJEE, S.; MAJUMDER, S.; CHOWDHURY, B. P.; GOSWAMI, A.; HALDER, K.; CHAKRABORTY, U.; PAL, N. K.; MAJUMDAR, S. Immune subversion by Mycobacterium tuberculosis through CCR5 mediated signaling: involvement of IL-10. *PLoS One*, v. 9, n. 4, p. e92477, 2014.

DAVIES, E. V.; SINGLETON, A. M.; BLACKWELL, J. M. Differences in Lsh gene control over systemic Leishmania major and Leishmania donovani or Leishmania mexicana mexicana infections are caused by differential targeting to infiltrating and resident liver macrophage populations. *Infect Immun*, v. 56, n. 5, p. 1128-34, May 1988.

DE FARIA, T. J.; ROMAN, M.; DE SOUZA, N. M.; DE VECCHI, R.; DE ASSIS, J. V.; DOS SANTOS, A. L.; BECHTOLD, I. H.; WINTER, N.; SOARES, M. J.; SILVA, L. P.; DE ALMEIDA, M. V.; BAFICA, A. An isoniazid analogue promotes Mycobacterium tuberculosis-nanoparticle interactions and enhances bacterial killing by macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 56, n. 5, p. 2259-67, May 2012.

DRAGIC, T.; LITWIN, V.; ALLAWAY, G. P.; MARTIN, S. R.; HUANG, Y.; NAGASHIMA, K. A.; CAYANAN, C.; MADDON, P. J.; KOUP, R. A.; MOORE, J. P.; PAXTON, W. A. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*, v. 381, n. 6584, p. 667-73, Jun 20 1996.

DRANOFF, G.; CRAWFORD, A. D.; SADELAIN, M.; REAM, B.; RASHID, A.; BRONSON, R. T.; DICKERSIN, G. R.; BACHURSKI, C. J.; MARK, E. L.; WHITSETT, J. A.; ET AL. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science*, v. 264, n. 5159, p. 713-6, Apr 29 1994.

DUNKELBERGER, J.; ZHOU, L.; MIWA, T.; SONG, W. C. C5aR expression in a novel GFP reporter gene knockin mouse: implications for the mechanism of action of C5aR signaling in T cell immunity. *J Immunol*, v. 188, n. 8, p. 4032-42, Apr 15 2012.

DUZGUN, N.; PEKSARI, Y.; SONEL, B.; YUCESAN, C.; EREKUL, S.; DUMAN, M. Localization of extrapulmonary tuberculosis in the synovial membrane, skin, and meninges in a patient with systemic lupus erythematosus and IgG deficiency. *Rheumatol Int*, v. 22, n. 1, p. 41-4, May 2002.

EGWANG, T. G.; GAULDIE, J.; BEFUS, D. Complement-dependent killing of *Nippostrongylus brasiliensis* infective larvae by rat alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*, v. 55, n. 1, p. 149-56, Jan 1984.

EZEKOWITZ, R. A.; GORDON, S. Down-regulation of mannosyl receptor-mediated endocytosis and antigen F4/80 in bacillus Calmette-Guerin-activated mouse macrophages. Role of T lymphocytes and lymphokines. *J Exp Med*, v. 155, n. 6, p. 1623-37, Jun 1 1982.

EZEKOWITZ, R. A.; SIM, R. B.; HILL, M.; GORDON, S. Local opsonization by secreted macrophage complement components. Role of receptors for complement in uptake of zymosan. *J Exp Med*, v. 159, n. 1, p. 244-60, Jan 1 1984.

FARZAN, M.; MIRZABEKOV, T.; KOLCHINSKY, P.; WYATT, R.; CAYABYAB, M.; GERARD, N. P.; GERARD, C.; SODROSKI, J.; CHOE, H. Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell*, v. 96, n. 5, p. 667-76, Mar 5 1999.

FLESCH, I.; KAUFMANN, S. H. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, v. 138, n. 12, p. 4408-13, Jun 15 1987.

FLOTO, R. A.; MACARY, P. A.; BONAME, J. M.; MIEN, T. S.; KAMPMANN, B.; HAIR, J. R.; HUEY, O. S.; HOUBEN, E. N.; PIETERS, J.; DAY, C.; OEHLMANN, W.; SINGH, M.; SMITH, K. G.; LEHNER, P. J. Dendritic cell stimulation by mycobacterial Hsp70 is mediated through CCR5. *Science*, v. 314, n. 5798, p. 454-8, Oct 20 2006.

FLYNN, J. L.; CHAN, J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol*, v. 15, n. 4, p. 450-5, Aug 2003.

FRANCKE, A.; HEROLD, J.; WEINERT, S.; STRASSER, R. H.; BRAUN-DULLAEUS, R. C. Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *J Histochem Cytochem*, v. 59, n. 9, p. 813-25, Sep 2011.

FRANKENBERGER, M.; MENZEL, M.; BETZ, R.; KASSNER, G.; WEBER, N.; KOHLHAUFL, M.; HAUSSINGER, K.; ZIEGLER-HEITBROCK, L. Characterization of a population of small macrophages in induced sputum of patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy volunteers. *Clin Exp Immunol*, v. 138, n. 3, p. 507-16, Dec 2004.

GARRATT, L. W.; WRIGHT, A. K.; RANGANATHAN, S. C.; GRIGG, J.; SLY, P. D.; BEHALF OF, A. C. Small macrophages are present in early childhood respiratory disease. *J Cyst Fibros*, v. 11, n. 3, p. 201-8, May 2012.

GHOSN, E. E.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, K. R.; ALMEIDA, S. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 6, p. 2568-73, Feb 9 2010.

GINHOUX, F.; GRETER, M.; LEBOEUF, M.; NANDI, S.; SEE, P.; GOKHAN, S.; MEHLER, M. F.; CONWAY, S. J.; NG, L. G.; STANLEY, E. R.; SAMOKHVALOV, I. M.; MERAD, M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, v. 330, n. 6005, p. 841-5, Nov 5 2010.

GJOMARKAJ, M.; PACE, E.; MELIS, M.; SPATAFORA, M.; PROFITA, M.; VIGNOLA, A. M.; BONSIGNORE, G.; TOEWS, G. B. Phenotypic and functional characterization of normal rat pleural macrophages in comparison with autologous peritoneal and alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 20, n. 1, p. 135-42, Jan 1999.

GLICKMAN, M. S.; JACOBS, W. R., JR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell*, v. 104, n. 4, p. 477-85, Feb 23 2001.

GOLDEN, M. P.; VIKRAM, H. R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician*, v. 72, n. 9, p. 1761-8, Nov 1 2005.

GONZALEZ-JUARRERO, M.; SHIM, T. S.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; ORME, I. M. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. *J Immunol*, v. 171, n. 6, p. 3128-35, Sep 15 2003.

GOODELL, M. A.; BROSE, K.; PARADIS, G.; CONNER, A. S.; MULLIGAN, R. C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, v. 183, n. 4, p. 1797-806, Apr 1 1996.

GUILLIAMS, M.; DE KLEER, I.; HENRI, S.; POST, S.; VANHOUTTE, L.; DE PRIJCK, S.; DESWARTE, K.; MALISSEN, B.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B. N. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med*, v. 210, n. 10, p. 1977-92, Sep 23 2013.

HAMERMAN, J. A.; ADEREM, A. Functional transitions in macrophages during in vivo infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol*, v. 167, n. 4, p. 2227-33, Aug 15 2001.

HANEKOM, W. A.; MENDILLO, M.; MANCA, C.; HASLETT, P. A.; SIDDIQUI, M. R.; BARRY, C., 3RD; KAPLAN, G. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits maturation of human monocyte-derived dendritic cells in vitro. *J Infect Dis*, v. 188, n. 2, p. 257-66, Jul 15 2003.

HASHIMOTO, D.; CHOW, A.; NOIZAT, C.; TEO, P.; BEASLEY, M. B.; LEBOEUF, M.; BECKER, C. D.; SEE, P.; PRICE, J.; LUCAS, D.; GRETER, M.; MORTHA, A.; BOYER, S. W.; FORSBERG, E. C.; TANAKA, M.; VAN ROOIJEN, N.; GARCIA-SASTRE, A.; STANLEY, E. R.; GINHOUX, F.; FRENETTE, P. S.; MERAD, M. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life

with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, v. 38, n. 4, p. 792-804, Apr 18 2013.

HAWKES, M.; LI, X.; CROCKETT, M.; DIASSITI, A.; FINNEY, C.; MIN-OO, G.; LILES, W. C.; LIU, J.; KAIN, K. C. CD36 deficiency attenuates experimental mycobacterial infection. *BMC Infect Dis*, v. 10, p. 299, 2010.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*, v. 159, n. 2, p. 635-43, Jul 15 1997.

HICKSTEIN, D. D.; OZOLS, J.; WILLIAMS, S. A.; BAENZIGER, J. U.; LOCKSLEY, R. M.; ROTH, G. J. Isolation and characterization of the receptor on human neutrophils that mediates cellular adherence. *J Biol Chem*, v. 262, n. 12, p. 5576-80, Apr 25 1987.

HIRIYANNA, K. T.; RAMAKRISHNAN, T. Deoxyribonucleic acid replication time in Mycobacterium tuberculosis H37 Rv. *Arch Microbiol*, v. 144, n. 2, p. 105-9, Mar 1986.

HIRSCH, S.; AUSTYN, J. M.; GORDON, S. Expression of the macrophage-specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cells in culture. *J Exp Med*, v. 154, n. 3, p. 713-25, Sep 1 1981.

HO, M. K.; SPRINGER, T. A. Tissue distribution, structural characterization, and biosynthesis of Mac-3, a macrophage surface glycoprotein exhibiting molecular weight heterogeneity. *J Biol Chem*, v. 258, n. 1, p. 636-42, Jan 10 1983.

HOEFFEL, G.; WANG, Y.; GRETER, M.; SEE, P.; TEO, P.; MALLERET, B.; LEBOEUF, M.; LOW, D.; OLLER, G.; ALMEIDA, F.; CHOY, S. H.; GRISOTTO, M.; RENIA, L.; CONWAY, S. J.; STANLEY, E. R.; CHAN, J. K.; NG, L. G.; SAMOKHVALOV, I. M.; MERAD, M.; GINHOUX, F. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med*, v. 209, n. 6, p. 1167-81, Jun 4 2012.

HOPKEN, U. E.; LU, B.; GERARD, N. P.; GERARD, C. The C5a chemoattractant receptor mediates mucosal defence to infection. *Nature*, v. 383, n. 6595, p. 86-9, Sep 5 1996.

HOPKINSON-WOOLLEY, J.; HUGHES, D.; GORDON, S.; MARTIN, P. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J Cell Sci*, v. 107 (Pt 5), p. 1159-67, May 1994.

HOUGHTON, A. M.; HARTZELL, W. O.; ROBBINS, C. S.; GOMIS-RUTH, F. X.; SHAPIRO, S. D. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature*, v. 460, n. 7255, p. 637-41, Jul 30 2009.

HUSSAIN, S.; STOHLMAN, S. A. Peritoneal macrophage from male and female SJL mice differ in IL-10 expression and macrophage maturation. *J Leukoc Biol*, v. 91, n. 4, p. 571-9, Apr 2012.

HUTTENRAUCH, F.; POLLOK-KOPP, B.; OPPERMAN, M. G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and beta-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers. *J Biol Chem*, v. 280, n. 45, p. 37503-15, Nov 11 2005.

IKEGAMI, M.; UEDA, T.; HULL, W.; WHITSETT, J. A.; MULLIGAN, R. C.; DRANOFF, G.; JOBE, A. H. Surfactant metabolism in transgenic mice after granulocyte macrophage-colony stimulating factor ablation. *Am J Physiol*, v. 270, n. 4 Pt 1, p. L650-8, Apr 1996.

ISHIBASHI, Y.; ARAI, T. Roles of the complement receptor type 1 (CR1) and type 3 (CR3) on phagocytosis and subsequent phagosome-lysosome fusion in Salmonella-infected murine macrophages. *FEMS Microbiol Immunol*, v. 2, n. 2, p. 89-96, Sep 1990.

ISHIKAWA, E.; ISHIKAWA, T.; MORITA, Y. S.; TOYONAGA, K.; YAMADA, H.; TAKEUCHI, O.; KINOSHITA, T.; AKIRA, S.; YOSHIKAI, Y.; YAMASAKI, S. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med*, v. 206, n. 13, p. 2879-88, Dec 21 2009.

JAMBO, K. C.; BANDA, D. H.; KANKWATIRA, A. M.; SUKUMAR, N.; ALLAIN, T. J.; HEYDERMAN, R. S.; RUSSELL, D. G.; MWANDUMBA, H. C. Small alveolar macrophages are infected preferentially by HIV and exhibit impaired phagocytic function. *Mucosal Immunol*, v. 7, n. 5, p. 1116-26, Sep 2014.

JONSSON, S.; MUSHER, D. M.; CHAPMAN, A.; GOREE, A.; LAWRENCE, E. C. Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages. *J Infect Dis*, v. 152, n. 1, p. 4-13, Jul 1985.

KANG, Y. S.; KIM, J. Y.; BRUENING, S. A.; PACK, M.; CHARALAMBOUS, A.; PRITSKER, A.; MORAN, T. M.; LOEFFLER, J. M.; STEINMAN, R. M.; PARK, C. G. The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 1, p. 215-20, Jan 6 2004.

KANNAN, K.; STEWART, R. M.; BOUNDS, W.; CARLSSON, S. R.; FUKUDA, M.; BETZING, K. W.; HOLCOMBE, R. F. Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol*, v. 171, n. 1, p. 10-9, Jul 10 1996.

KAWASAKI, N.; VELA, J. L.; NYCHOLAT, C. M.; RADEMACHER, C.; KHURANA, A.; VAN ROOIJEN, N.; CROCKER, P. R.; KRONENBERG, M.; PAULSON, J. C. Targeted delivery of lipid antigen to macrophages via the CD169/sialoadhesin endocytic pathway induces robust invariant natural killer T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, n. 19, p. 7826-31, May 7 2013.

KIESER, K. J.; RUBIN, E. J. How sisters grow apart: mycobacterial growth and division. *Nat Rev Microbiol*, v. 12, n. 8, p. 550-62, Aug 2014.

KLEIN, I.; CORNEJO, J. C.; POLAKOS, N. K.; JOHN, B.; WUENSCH, S. A.; TOPHAM, D. J.; PIERCE, R. H.; CRISPE, I. N. Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages. *Blood*, v. 110, n. 12, p. 4077-85, Dec 1 2007.

KOCH, R. The etiology of tuberculosis. *Berl. Klin. Wochenschr*, v. 15, p. 221-230, 1882.

KONDO, H.; SAITO, K.; GRASSO, J. P.; AISEN, P. Iron metabolism in the erythrophagocytosing Kupffer cell. *Hepatology*, v. 8, n. 1, p. 32-8, Jan-Feb 1988.

KRAUSE, D. S.; ITO, T.; FACKLER, M. J.; SMITH, O. M.; COLLECTOR, M. I.; SHARKIS, S. J.; MAY, W. S. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, v. 84, n. 3, p. 691-701, Aug 1 1994.

KRISTIANSEN, M.; GRAVERSEN, J. H.; JACOBSEN, C.; SONNE, O.; HOFFMAN, H. J.; LAW, S. K.; MOESTRUP, S. K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, v. 409, n. 6817, p. 198-201, Jan 11 2001.

KUMAR, S. K.; SINGH, P.; SINHA, S. Naturally produced opsonizing antibodies restrict the survival of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages by augmenting phagosome maturation. *Open Biol*, v. 5, n. 12, Dec 2015.

KUNA, P.; REDDIGARI, S. R.; RUCINSKI, D.; OPPENHEIM, J. J.; KAPLAN, A. P. Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. *J Exp Med*, v. 175, n. 2, p. 489-93, Feb 1 1992.

LADNER, M. B.; MARTIN, G. A.; NOBLE, J. A.; WITTMAN, V. P.; WARREN, M. K.; MCGROGAN, M.; STANLEY, E. R. cDNA cloning and expression of murine macrophage colony-stimulating factor from L929 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 85, n. 18, p. 6706-10, Sep 1988.

LAVIN, Y.; MERAD, M. Macrophages: gatekeepers of tissue integrity. *Cancer Immunol Res*, v. 1, n. 4, p. 201-9, Oct 2013.

LEDERER, E.; ADAM, A.; CIORBARU, R.; PETIT, J. F.; WIETZERBIN, J. Cell walls of Mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties. *Mol Cell Biochem*, v. 7, n. 2, p. 87-104, May 30 1975.

LEE, C. M.; HU, J. Cell density during differentiation can alter the phenotype of bone marrow-derived macrophages. *Cell Biosci*, v. 3, p. 30, 2013.

LEEMANS, J. C.; FLORQUIN, S.; HEIKENS, M.; PALS, S. T.; VAN DER NEUT, R.; VAN DER POLL, T. CD44 is a macrophage binding site for *Mycobacterium tuberculosis* that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest*, v. 111, n. 5, p. 681-9, Mar 2003.

LIN, H. H.; FAUNCE, D. E.; STACEY, M.; TERAJEWICZ, A.; NAKAMURA, T.; ZHANG-HOOVER, J.; KERLEY, M.; MUCENSKI, M. L.; GORDON, S.; STEIN-STREILEIN, J. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med*, v. 201, n. 10, p. 1615-25, May 16 2005.

LIU, G.; XIA, X. P.; GONG, S. L.; ZHAO, Y. The macrophage heterogeneity: difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80+ macrophages. *J Cell Physiol*, v. 209, n. 2, p. 341-52, Nov 2006.

LOBOV, I. B.; RAO, S.; CARROLL, T. J.; VALLANCE, J. E.; ITO, M.; ONDR, J. K.; KURUP, S.; GLASS, D. A.; PATEL, M. S.; SHU, W.; MORRISEY, E. E.; MCMAHON, A. P.; KARSENTY, G.; LANG, R. A. WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature*, v. 437, n. 7057, p. 417-21, Sep 15 2005.

LONDON, A.; COHEN, M.; SCHWARTZ, M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front Cell Neurosci*, v. 7, p. 34, 2013.

LUCAS, T.; WAISMAN, A.; RANJAN, R.; ROES, J.; KRIEG, T.; MULLER, W.; ROERS, A.; EMING, S. A. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol*, v. 184, n. 7, p. 3964-77, Apr 1 2010.

MAHYUDIN, M.; CHOO, M. M.; RAMLI, N. M.; OMAR, S. S. Ocular Tuberculosis Initially Presenting as Central Retinal Vein Occlusion. *Case Rep Ophthalmol*, v. 1, n. 1, p. 30-35, 2010.

MANNI, M. L.; TOMAI, L. P.; NORRIS, C. A.; THOMAS, L. M.; KELLEY, E. E.; SALTER, R. D.; CRAPO, J. D.; CHANG, L. Y.; WATKINS, S. C.; PIGANELLI, J. D.; OURY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in macrophages augments bacterial killing by promoting phagocytosis. *Am J Pathol*, v. 178, n. 6, p. 2752-9, Jun 2011.

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N.; LIMA, D. S., JR.; ZAMBONI, D. S. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *PLoS One*, v. 5, n. 12, p. e15263, 2010.

MAY, M. E.; SPAGNUOLO, P. J. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*, v. 55, n. 9, p. 2304-7, Sep 1987.

MCKNIGHT, A. J.; MACFARLANE, A. J.; DRI, P.; TURLEY, L.; WILLIS, A. C.; GORDON, S. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J Biol Chem*, v. 271, n. 1, p. 486-9, Jan 5 1996.

MEANS, T. K.; JONES, B. W.; SCHROMM, A. B.; SHURTLEFF, B. A.; SMITH, J. A.; KEANE, J.; GOLENBOCK, D. T.; VOGEL, S. N.; FENTON, M. J. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. *J Immunol*, v. 166, n. 6, p. 4074-82, Mar 15 2001.

MEDLAR, E. M. The behavior of pulmonary tuberculous lesions; a pathological study. *Am Rev Tuberc*, v. 71, n. 3, Part 2, p. 1-244, Mar 1955.

METCHNIKOFF, E., v. Biol. Zentralblatt. , n. 3, p. 560-565, 1883.

METCHNIKOFF, E. *Arb. Zool. Inst. Univ. wien. u. Zool. Stat. Triest.* , v. 5, p. 141-168, 1884a.

METCHNIKOFF, E. *Virchows Arch*, v. 96, p. 177–195, 1884b.

MICHAELSON, M. D.; BIERI, P. L.; MEHLER, M. F.; XU, H.; AREZZO, J. C.; POLLARD, J. W.; KESSLER, J. A. CSF-1 deficiency in mice results in abnormal brain development. *Development*, v. 122, n. 9, p. 2661-72, Sep 1996.

MIN, B. K.; SUK, K.; LEE, W. H. Stimulation of CD107 affects LPS-induced cytokine secretion and cellular adhesion through the ERK signaling pathway in the human macrophage-like cell line, THP-1. *Cell Immunol*, v. 281, n. 2, p. 122-8, Feb 2013.

MIRZA, R.; DIPIETRO, L. A.; KOH, T. J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol*, v. 175, n. 6, p. 2454-62, Dec 2009.

MIYAKE, Y.; ASANO, K.; KAISE, H.; UEMURA, M.; NAKAYAMA, M.; TANAKA, M. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest*, v. 117, n. 8, p. 2268-78, Aug 2007.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; LEATHERS, H.; DORSHKIND, K. Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol*, v. 2, n. 1, p. 83-8, Jan 2001.

MORGADO, P.; SUDARSHANA, D. M.; GOV, L.; HARKER, K. S.; LAM, T.; CASALI, P.; BOYLE, J. P.; LODOEN, M. B. Type II *Toxoplasma gondii* induction of CD40 on infected macrophages enhances interleukin-12 responses. *Infect Immun*, v. 82, n. 10, p. 4047-55, Oct 2014.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol*, v. 135, n. 4, p. 2785-9, Oct 1985.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania* major. *Nature*, v. 327, n. 6120, p. 329-31, May 28-Jun 3 1987.

MURRAY, P. J.; ALLEN, J. E.; BISWAS, S. K.; FISHER, E. A.; GILROY, D. W.; GOERDT, S.; GORDON, S.; HAMILTON, J. A.;

IVASHKIV, L. B.; LAWRENCE, T.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A.; MARTINEZ, F. O.; MEGE, J. L.; MOSSER, D. M.; NATOLI, G.; SAEIJ, J. P.; SCHULTZE, J. L.; SHIREY, K. A.; SICA, A.; SUTTLES, J.; UDALOVA, I.; VAN GINDERACHTER, J. A.; VOGEL, S. N.; WYNN, T. A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 14-20, Jul 17 2014.

NORBURY, C. C.; HEWLETT, L. J.; PRESCOTT, A. R.; SHASTRI, N.; WATTS, C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity*, v. 3, n. 6, p. 783-91, Dec 1995.

NOSS, E. H.; HARDING, C. V.; BOOM, W. H. Mycobacterium tuberculosis inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages. *Cell Immunol*, v. 201, n. 1, p. 63-74, Apr 10 2000.

O'GARRA, A.; REDFORD, P. S.; MCNAB, F. W.; BLOOM, C. I.; WILKINSON, R. J.; BERRY, M. P. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, v. 31, p. 475-527, 2013.

ODEGAARD, J. I.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; GOFORTH, M. H.; MOREL, C. R.; SUBRAMANIAN, V.; MUKUNDAN, L.; RED EAGLE, A.; VATS, D.; BROMBACHER, F.; FERRANTE, A. W.; CHAWLA, A. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, v. 447, n. 7148, p. 1116-20, Jun 28 2007.

OISHI, M.; OKAMOTO, S.; TERANISHI, Y.; YOKOTA, C.; TAKANO, S.; IGUCHI, H. Clinical Study of Extrapulmonary Head and Neck Tuberculosis: A Single-Institute 10-year Experience. *Int Arch Otorhinolaryngol*, v. 20, n. 1, p. 30-3, Jan 2016.

OKAMOTO, Y.; VRICELLA, L. A.; MOSS, W. J.; GRIFFIN, D. E. Immature CD4+CD8+ thymocytes are preferentially infected by measles virus in human thymic organ cultures. *PLoS One*, v. 7, n. 9, p. e45999, 2012.

PAOLICELLI, R. C.; BOLASCO, G.; PAGANI, F.; MAGGI, L.; SCIANNI, M.; PANZANELLI, P.; GIUSTETTO, M.; FERREIRA, T.

A.; GUIDUCCI, E.; DUMAS, L.; RAGOZZINO, D.; GROSS, C. T. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, v. 333, n. 6048, p. 1456-8, Sep 9 2011.

PODINOVSKAIA, M.; LEE, W.; CALDWELL, S.; RUSSELL, D. G. Infection of macrophages with *Mycobacterium tuberculosis* induces global modifications to phagosomal function. *Cell Microbiol*, v. 15, n. 6, p. 843-59, Jun 2013.

RAKOFF-NAHOUM, S.; PAGLINO, J.; ESLAMI-VARZANEH, F.; EDBERG, S.; MEDZHITOV, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, v. 118, n. 2, p. 229-41, Jul 23 2004.

REDFORD, P. S.; MURRAY, P. J.; O'GARRA, A. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection. *Mucosal Immunol*, v. 4, n. 3, p. 261-70, May 2011.

REMOLD-O'DONNELL, E. Regulation of synthesis of macrophage adhesion molecule, a heterodimeric membrane glycoprotein. *J Immunol*, v. 140, n. 4, p. 1244-9, Feb 15 1988.

REMOLD-O'DONNELL, E.; SAVAGE, B. Purification, composition, and structure of macrophage adhesion molecule. *Biochemistry*, v. 27, n. 1, p. 42-5, Jan 12 1988.

ROOYAKKERS, A. W.; STOKES, R. W. Absence of complement receptor 3 results in reduced binding and ingestion of *Mycobacterium tuberculosis* but has no significant effect on the induction of reactive oxygen and nitrogen intermediates or on the survival of the bacteria in resident and interferon-gamma activated macrophages. *Microb Pathog*, v. 39, n. 3, p. 57-67, Sep 2005.

SAMSON, M.; LABBE, O.; MOLLEREAU, C.; VASSART, G.; PARMENTIER, M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry*, v. 35, n. 11, p. 3362-7, Mar 19 1996.

SANCHEZ-MADRID, F.; SIMON, P.; THOMPSON, S.; SPRINGER, T. A. Mapping of antigenic and functional epitopes on the alpha- and beta-subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell

interactions, LFA-1 and Mac-1. *J Exp Med*, v. 158, n. 2, p. 586-602, Aug 1 1983.

SAUNDERS, B. M.; BRITTON, W. J. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*, v. 85, n. 2, p. 103-11, Feb-Mar 2007.

SCHAER, C. A.; SCHOEDON, G.; IMHOF, A.; KURRER, M. O.; SCHAER, D. J. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circ Res*, v. 99, n. 9, p. 943-50, Oct 27 2006.

SCHAFER, G.; GULER, R.; MURRAY, G.; BROMBACHER, F.; BROWN, G. D. The role of scavenger receptor B1 in infection with *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *PLoS One*, v. 4, n. 12, p. e8448, 2009.

SCHALL, T. J.; BACON, K.; CAMP, R. D.; KASPARI, J. W.; GOEDEL, D. V. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med*, v. 177, n. 6, p. 1821-6, Jun 1 1993.

SCHALL, T. J.; BACON, K.; TOY, K. J.; GOEDEL, D. V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, v. 347, n. 6294, p. 669-71, Oct 18 1990.

SCHALLER, E.; MACFARLANE, A. J.; RUPEC, R. A.; GORDON, S.; MCKNIGHT, A. J.; PFEFFER, K. Inactivation of the F4/80 glycoprotein in the mouse germ line. *Mol Cell Biol*, v. 22, n. 22, p. 8035-43, Nov 2002.

SCHLESINGER, L. S. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol*, v. 150, n. 7, p. 2920-30, Apr 1 1993.

SCHLESINGER, L. S. Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 215, p. 71-96, 1996.

SCHLESINGER, L. S.; BELLINGER-KAWAHARA, C. G.; PAYNE, N. R.; HORWITZ, M. A. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol*, v. 144, n. 7, p. 2771-80, Apr 1 1990.

SCHLESINGER, L. S.; KAUFMAN, T. M.; IYER, S.; HULL, S. R.; MARCHIANDO, L. K. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol*, v. 157, n. 10, p. 4568-75, Nov 15 1996.

SCHULZ, C.; GOMEZ PERDIGUERO, E.; CHORRO, L.; SZABO-ROGERS, H.; CAGNARD, N.; KIERDORF, K.; PRINZ, M.; WU, B.; JACOBSEN, S. E.; POLLARD, J. W.; FRAMPTON, J.; LIU, K. J.; GEISSMANN, F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, v. 336, n. 6077, p. 86-90, Apr 6 2012.

SCOTT ALGOOD, H. M.; FLYNN, J. L. CCR5-Deficient Mice Control *Mycobacterium tuberculosis* Infection despite Increased Pulmonary Lymphocytic Infiltration. *The Journal of Immunology*, v. 173, n. 5, p. 3287-3296, 2004.

SCOTT, R. S.; MCMAHON, E. J.; POP, S. M.; REAP, E. A.; CARICCHIO, R.; COHEN, P. L.; EARP, H. S.; MATSUSHIMA, G. K. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*, v. 411, n. 6834, p. 207-11, May 10 2001.

SEVER-CHRONEOS, Z.; TVINNEREIM, A.; HUNTER, R. L.; CHRONEOS, Z. C. Prolonged survival of scavenger receptor class A-deficient mice from pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis (Edinb)*, v. 91 Suppl 1, p. S69-74, Dec 2011.

SHENOI, S.; HEYSELL, S.; MOLL, A.; FRIEDLAND, G. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: consequences for the global HIV community. *Curr Opin Infect Dis*, v. 22, n. 1, p. 11-7, Feb 2009.

SILVA FILHO, F. C.; SANTOS, A. B.; DE CARVALHO, T. M.; DE SOUZA, W. Surface charge of resident, elicited, and activated mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*, v. 41, n. 2, p. 143-9, Feb 1987.

SILVER, R. F.; LI, Q.; ELLNER, J. J. Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infect Immun*, v. 66, n. 3, p. 1190-9, Mar 1998.

SMYTHIES, L. E.; SELLERS, M.; CLEMENTS, R. H.; MOSTELLER-BARNUM, M.; MENG, G.; BENJAMIN, W. H.; ORENSTEIN, J. M.; SMITH, P. D. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest*, v. 115, n. 1, p. 66-75, Jan 2005.

SONNENFELD, M. J.; JACOBS, J. R. Macrophages and glia participate in the removal of apoptotic neurons from the *Drosophila* embryonic nervous system. *J Comp Neurol*, v. 359, n. 4, p. 644-52, Sep 4 1995.

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, v. 241, n. 4861, p. 58-62, Jul 1 1988.

SPRINGER, T.; GALFRE, G.; SECHER, D. S.; MILSTEIN, C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol*, v. 9, n. 4, p. 301-6, Apr 1979.

STANLEY, E. R.; CIFONE, M.; HEARD, P. M.; DEFENDI, V. Factors regulating macrophage production and growth: identity of colony-stimulating factor and macrophage growth factor. *J Exp Med*, v. 143, n. 3, p. 631-47, Mar 1 1976.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P. H.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P. L.; COLLINS, H. L.; FOK, A. K.; ALLEN, R. D.; GLUCK, S. L.; HEUSER, J.; RUSSELL, D. G. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, v. 263, n. 5147, p. 678-81, Feb 4 1994.

SUTTERWALA, F. S.; ROSENTHAL, L. A.; MOSSER, D. M. Cooperation between CR1 (CD35) and CR3 (CD 11b/CD18) in the

binding of complement-opsonized particles. *J Leukoc Biol*, v. 59, n. 6, p. 883-90, Jun 1996.

TABATA, Y.; IKADA, Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage. *Biomaterials*, v. 9, n. 4, p. 356-62, Jul 1988.

TAILLEUX, L.; SCHWARTZ, O.; HERRMANN, J. L.; PIVERT, E.; JACKSON, M.; AMARA, A.; LEGRES, L.; DREHER, D.; NICOD, L. P.; GLUCKMAN, J. C.; LAGRANGE, P. H.; GICQUEL, B.; NEYROLLES, O. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*, v. 197, n. 1, p. 121-7, Jan 6 2003.

TAMOUTOUNOUR, S.; GUILLIAMS, M.; MONTANANA SANCHIS, F.; LIU, H.; TERHORST, D.; MALOSSE, C.; POLLET, E.; ARDOUIN, L.; LUCHE, H.; SANCHEZ, C.; DALOD, M.; MALISSEN, B.; HENRI, S. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, v. 39, n. 5, p. 925-38, Nov 14 2013.

TIAN, T.; WOODWORTH, J.; SKOLD, M.; BEHAR, S. M. In vivo depletion of CD11c⁺ cells delays the CD4⁺ T cell response to Mycobacterium tuberculosis and exacerbates the outcome of infection. *J Immunol*, v. 175, n. 5, p. 3268-72, Sep 1 2005.

TORRES, M.; RAMACHANDRA, L.; ROJAS, R. E.; BOBADILLA, K.; THOMAS, J.; CANADAY, D. H.; HARDING, C. V.; BOOM, W. H. Role of phagosomes and major histocompatibility complex class II (MHC-II) compartment in MHC-II antigen processing of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Infect Immun*, v. 74, n. 3, p. 1621-30, Mar 2006.

TORUN, T.; GUNGOR, G.; OZMEN, I.; BOLUKBASI, Y.; MADEN, E.; BICAKCI, B.; ATAC, G.; SEVIM, T.; TAHAOGLU, K. Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, v. 9, n. 12, p. 1373-7, Dec 2005.

UEDA, Y.; KAYAMA, H.; JEON, S. G.; KUSU, T.; ISAKA, Y.; RAKUGI, H.; YAMAMOTO, M.; TAKEDA, K. Commensal

microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *Int Immunol*, v. 22, n. 12, p. 953-62, Dec 2010.

ULRICHS, T.; KAUFMANN, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol*, v. 208, n. 2, p. 261-9, Jan 2006.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A.; SMITH, K. D.; ADEREM, A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 25, p. 14459-63, Dec 7 1999.

VACHERON, S.; LUTHER, S. A.; ACHA-ORBEA, H. Preferential infection of immature dendritic cells and B cells by mouse mammary tumor virus. *J Immunol*, v. 168, n. 7, p. 3470-6, Apr 1 2002.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, v. 128, n. 3, p. 415-35, Sep 1 1968.

VAN FURTH, R.; COHN, Z. A.; HIRSCH, J. G.; HUMPHREY, J. H.; SPECTOR, W. G.; LANGEVOORT, H. L. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*, v. 46, n. 6, p. 845-52, 1972.

VENYO, A. K. Tuberculosis of the Penis: A Review of the Literature. *Scientifica (Cairo)*, v. 2015, p. 601624, 2015.

VIEGAS, S. O.; GHEBREMICHAEL, S.; MASSAWO, L.; ALBERTO, M.; FERNANDES, F. C.; MONTEIRO, E.; COUVIN, D.; MATAVELE, J. M.; RASTOGI, N.; CORREIA-NEVES, M.; MACHADO, A.; CARRILHO, C.; GROENHEIT, R.; KALLENIOUS, G.; KOIVULA, T. Mycobacterium tuberculosis causing tuberculous lymphadenitis in Maputo, Mozambique. *BMC Microbiol*, v. 15, n. 1, p. 268, 2015.

WALKER, E. B.; AKPORIAYE, E. T.; WARNER, N. L.; STEWART, C. C. Characterization of subsets of bone marrow-derived macrophages by flow cytometry analysis. *J Leukoc Biol*, v. 37, n. 2, p. 121-36, Feb 1985.

WANG, C.; YU, X.; CAO, Q.; WANG, Y.; ZHENG, G.; TAN, T. K.; ZHAO, H.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; HARRIS, D. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol*, v. 14, p. 6, 2013.

WHO. World of Health Organization. 2015. Global Tuberculosis Report 2015, Geneva. World of Health Organization Press.

WIKTOR-JEDRZEJCZAK, W.; DZWIGALA, B.; SZPERL, M.; MARUSZYNSKI, M.; URBANOWSKA, E.; SZWECH, P. Colony-stimulating factor 1-dependent resident macrophages play a regulatory role in fighting *Escherichia coli* fecal peritonitis. *Infect Immun*, v. 64, n. 5, p. 1577-81, May 1996.

WILTSCHKE, C.; NEMET, H.; HOLZINGER, C.; GESSL, A.; PERNERSTORFER, T.; FORSTER, O.; BOLTZ-NITULESCU, G. Murine recombinant GM-CSF-driven rat bone marrow cell differentiation and factors suppressing cell proliferation. *Immunobiology*, v. 179, n. 2-3, p. 145-58, Jun 1989.

WOLF, A. J.; LINAS, B.; TREVEJO-NUNEZ, G. J.; KINCAID, E.; TAMURA, T.; TAKATSU, K.; ERNST, J. D. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol*, v. 179, n. 4, p. 2509-19, Aug 15 2007.

WRIGHT, A. K.; RAO, S.; RANGE, S.; EDER, C.; HOFER, T. P.; FRANKENBERGER, M.; KOBZIK, L.; BRIGHTLING, C.; GRIGG, J.; ZIEGLER-HEITBROCK, L. Pivotal Advance: Expansion of small sputum macrophages in CF: failure to express MARCO and mannose receptors. *J Leukoc Biol*, v. 86, n. 3, p. 479-89, Sep 2009.

WU, D.; MOLOFSKY, A. B.; LIANG, H. E.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; JOUIHAN, H. A.; BANDO, J. K.; CHAWLA, A.; LOCKSLEY, R. M. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*, v. 332, n. 6026, p. 243-7, Apr 8 2011.

XU, S.; COOPER, A.; STURGILL-KOSZYCKI, S.; VAN HEYNINGEN, T.; CHATTERJEE, D.; ORME, I.; ALLEN, P.; RUSSELL, D. G. Intracellular trafficking in Mycobacterium

tuberculosis and Mycobacterium avium-infected macrophages. *J Immunol*, v. 153, n. 6, p. 2568-78, Sep 15 1994.

YAMAMOTO-YAMAGUCHI, Y.; TOMIDA, M.; HOZUMI, M. Effect of mouse interferon on growth and differentiation of mouse bone marrow cells stimulated by two different types of colony-stimulating factor. *Blood*, v. 62, n. 3, p. 597-601, Sep 1983.

YARI, S.; HADIZADEH TASBITI, A. R.; GHANEI, M.; SHOKRGOZAR, M. A.; FATEH, A.; YARI, F.; BAHRMAND, A. Modified TB rapid test by proteinase K for rapid diagnosis of pleural tuberculosis. *APMIS*, Dec 23 2015.

YEE, D.; VALIQUETTE, C.; PELLETIER, M.; PARISIEN, I.; ROCHER, I.; MENZIES, D. Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 167, n. 11, p. 1472-7, Jun 1 2003.

YONA, S.; KIM, K. W.; WOLF, Y.; MILDNER, A.; VAROL, D.; BREKER, M.; STRAUSS-AYALI, D.; VIUKOV, S.; GUILLIAMS, M.; MISHARIN, A.; HUME, D. A.; PERLMAN, H.; MALISSEN, B.; ZELZER, E.; JUNG, S. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, v. 38, n. 1, p. 79-91, Jan 24 2013.

YOSHIDA, H.; HAYASHI, S.; KUNISADA, T.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, S.; OKAMURA, H.; SUDO, T.; SHULTZ, L. D.; NISHIKAWA, S. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, v. 345, n. 6274, p. 442-4, May 31 1990.

YOSHIDA, H.; KAWANE, K.; KOIKE, M.; MORI, Y.; UCHIYAMA, Y.; NAGATA, S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature*, v. 437, n. 7059, p. 754-8, Sep 29 2005.

ZASLONA, Z.; SEREZANI, C. H.; OKUNISHI, K.; ARONOFF, D. M.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 restrains macrophage maturation via E prostanoid receptor 2/protein kinase A signaling. *Blood*, v. 119, n. 10, p. 2358-67, Mar 8 2012.

ZIMMERLI, S.; EDWARDS, S.; ERNST, J. D. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 15, n. 6, p. 760-70, Dec 1996.